

509,032

Rec'd PCT/PTO 27 SEP 2004

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 10 月 2 日 (02.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/080821 A1(51) 国際特許分類: C12N 5/08, 15/09, A01K 67/027,
C12P 21/08, C07K 16/18, C12N 5/18, A61L 27/00

(72) 発明者; および

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/03623

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 向谷 知世
(MUKAIDANI, Chise) [JP/JP]; 〒739-0024 広島県 東広島市 西条町御園字 6 0 9 1-1 1 Hiroshima (JP). 吉里 勝利 (YOSHIZATO, Katsutoshi) [JP/JP]; 〒739-0144 広島県 東広島市 八本松南 7-2 2-1 3 Hiroshima (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 25 日 (25.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都 渋谷区 宇田川町 3 7-1 0 麻仁ビル 6 階 Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-84280 2002 年 3 月 25 日 (25.03.2002) JP

(81) 指定国 (国内): CA, CN, JP, SG, US.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 財団法人ひろしま産業振興機構 (HIROSHIMA INDUSTRIAL PROMOTION ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒730-0052 広島県 広島市 中区千田町 3 丁目 7 番 4 7 号 Hiroshima (JP).

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PROLIFERATING HUMAN HEPATOCYTES AND METHOD OF OBTAINING HUMAN HEPATOCYTES

(54) 発明の名称: ヒト肝細胞増殖方法とヒト肝細胞の取得方法

(57) Abstract: Human hepatocytes are transplanted into the liver of a mouse suffering from immunodeficient hepatopathy and then the mouse carrying the human hepatocytes transplanted therein is fed under such conditions as being protected from the attack by a human complement produced by the human hepatocytes. Thus, the transplanted human hepatocytes are proliferated on a mass scale in the mouse liver. By repeating the above procedure with the use of the human hepatocytes thus proliferated, human hepatocytes are obtained in a large amount.

(57) 要約: 免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態でヒト肝細胞移植マウスを飼育することによって、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で大量に増殖させる。さらに、このようにして増殖させたヒト肝細胞を用いて前記の操作を繰り返すことによって、大量のヒト肝細胞を得る。

WO 03/080821 A1

明細書

ヒト肝細胞増殖方法とヒト肝細胞の取得方法

5

技術分野

この出願の発明は、マウス体内でヒト肝細胞を増殖させる方法、肝臓内にヒト肝細胞を有するキメラマウス、キメラマウスからのヒト肝細胞の取得方法と、これによって取得されたヒト肝細胞に関するものである。このようにしてキメラマウスから得られたヒト肝細胞は、肝細胞キットや体外型人工肝臓の材料となる。

背景技術

15 肝臓は 500 種類以上もの多種多様な特異機能を有する。肝臓の主な機能として、血漿蛋白質の合成分泌、糖新生やグリコーゲン代謝による血糖調節、脂質合成、尿素合成、胆汁合成分泌、解毒などが挙げられる。

体内に取り込まれた物質の多くは肝臓で代謝される。医薬品開発の領域では、
20 医薬品候補物質が肝臓でどのような代謝を受け、肝臓やその他の臓器や組織にどのような影響を与えるかは必須のデータである。さらに、これまで多くの化学物質が合成され環境へも放出されている。これらの物質が個々に、あるいは複合して人体にどのような影響をおよぼすかを解明することは、社会的にも非常に重要であり、このような化学物質の人体への影響評価にも肝機能に対する毒性試験が
25 必要とされている。

医薬品候補物質をはじめとする化学物質の安全性試験や薬物代謝試験には、現在のところ、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル等が使われている。特に医薬品開発ではヒトを対象とする第一相試験へ入る前に、動物を用いた毒性試験・安
30 全性試験が義務づけられているが、これには多大な時間と労力を必要とし、投資

額も莫大なものとなる。

しかしながら、これらの動物実験で得られるデータがそのままヒトに適応される保証はない。事実、動物実験では毒性の認められなかった物質がヒトに対して
5 毒性を示す例は多く、また逆の場合もあり得る。したがって、これまで多くの医薬品候補物質がヒトを対象とする第一相試験に入ってから開発中止となったり、また、動物実験では毒性が強いために臨床試験に入る前に開発中止となった物質においても、実際にはヒトには毒性が認められないケースも多く存在しているものと予想される。

10

このことは、ヒトの肝臓における代謝機能とマウスやラットの肝臓における代謝機能の違いが起因していると考えられている。最近では、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験や毒性試験が行われるようになった。ところが、移植に用いられなかった脳死患者の肝臓や腫瘍摘出などによる切除肝から得られるヒト肝細胞
15 の量は需要をはるかに下回っている。したがって、ヒト肝細胞の増殖技術の開発は医薬品開発において必要とされている。

また、大量のヒト肝細胞の必要性は、体外型人工肝臓においても同様である。人工肝臓は、人工的に肝臓機能を代行するための医療装置であり、吸着、透析、
20 濾過等の物理化学的原理に基づく人工的な作用と、摘出肝や肝組織の灌流による生物学的作用を組み合わせたハイブリッド型の人工肝臓の開発が精力的に進められている。この人工肝臓の開発に当たっては、物理化学的機能を向上させるための膜や回路の性能向上とともに、ヒトへの適用が可能な大量の肝細胞の供給が不可欠とされている。

25

しかしながら、ヒトの肝細胞については、これまで成熟個体から単離した初代細胞を継代的に培養することは不可能であるとされてきた。すなわち、接着依存性の成熟肝細胞は、その継代操作のために培養基質から剥離する際に大きく損傷し、また培養基質に再接着させることも困難なためである。これに対し、この出
30 願の発明者らは、ヒト肝臓から分離した正常肝細胞からクローン性増殖能を有す

る小型肝細胞を単離し、この小型肝細胞を初代培養し、さらにこの培養肝細胞を
継代培養して肝細胞を増殖させる方法を発明し、特許を取得している（特開平
08-112092 号公報；日本特許第 3266766 号；米国特許第 6,004,810 号、特開
平 10-179148 号公報；日本特許第 3211941 号、特開平 7-274951 公報；日本
5 特許第 3157984 号、特開平 9-313172 号公報；日本特許第 3014322 号）。

この特許発明の方法は、*in vitro* で肝細胞を増殖させて大量のヒト肝細胞を得
るための新しい手段を提供するものであるが、長期間の継代培養中に幾つかの肝
機能が低下してしまうという問題点を有していた。このため、例えば肝機能を維
10 持するための薬剤のスクリーニング系として、あるいは長期間の継代培養後も保
存されている特定の機能について薬剤の毒性や薬効を試験する系としては有用で
あるが、ヒト肝機能代替としての肝細胞として、またはハイブリット型人工肝臓
の材料としては不十分な点も存在する。

15 *in vitro* での肝細胞の増殖における以上のとおりの問題点を解消するための手
段として、動物個体内（*in vivo*）でヒト肝細胞を増殖させる方法が提案されて
いる。

例えば、Heckel らは、アルブミンウロキナーゼプラスミノゲンアクチベ
20 タートランスジェニックマウス（uPA-Tg マウス）を作製している。このマウス
においては、アルブミンのエンハンサーとプロモーターにウロキナーゼプラスミ
ノーゲンアクチベーター（uPA）遺伝子が接続してあるため、肝臓特異的に
uPA 蛋白が合成される（Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD,
and Brinster RL. Neonatal bleeding in transgenic mice expressing
25 urokinase-type plasminogen activator. Cell 62: 447-456, 1990）。肝細胞
は uPA 蛋白による傷害で、肉眼的には白色を呈し、出血や肝不全により死亡す
る個体もみられる。このマウスの脾臓より lacZ トランスジェニックマウスの正
常肝細胞を移植すると、肝臓に生着・増殖し、最終的にはドナー肝細胞で置き換
わることが知られている（Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD,
30 and Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell

- transplantation. Science 263:1149-1152, 1994)。さらに Rhim らは、
uPA-Tg マウスと胸腺を生まれつき欠損しているため T 細胞の機能を持たない
NUDE マウスを掛け合わせ、uPA-Tg/NUDE マウスを作製した。uPA-
Tg/NUDE マウスにラットの肝細胞を移植することにより、ラット肝細胞を持つ
5 マウスを作製した (Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD and Brinster RL.
Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 92: 4942-4946, 1995)。しかし、このマウスを用いた
ヒト肝細胞を持つキメラマウスの報告はない。
- 10 Dandri らは、uPA-Tg マウスと免疫不全の性質を持つノックアウトマウス
Rag2 マウスを掛け合わせ、uPA-Tg/Rag2 マウスを作製した。uPA-Tg (+/-)
/Rag2 マウスの肝臓へヒトの肝臓から採取したヒト肝細胞を移植し、マウス肝臓
の 15% が置き換わったことを示した。彼らはこのマウスへの B 型肝炎ウィルスの
感染に成功している (Dandri M, Burda MR, Torok B, Pollok JM, Iwanska A,
15 Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H, and
Petersen J. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in
vivo infection with hepatitis B virus. Hepatology 33:981-988, 2001)。

- また、この出願の発明者らは、先に特許出願した発明 (特開 2002-45087 号公
20 報) において、免疫不全マウスである SCID マウスと uPA-Tg マウスとを掛け合わ
せた uPA-Tg/SCID マウスにヒト肝細胞を移植し、この移植肝細胞が実質的にマ
ウスの肝機能を担っているキメラマウスを開示している。この先願発明のキメラ
マウスは、uPA 遺伝子の発現によってマウス肝細胞が機能不全となっているため、
その肝機能は移植されたヒト肝細胞によって保たれている。このため、移植した
25 ヒト肝細胞の個体内機能を正しく評価することができ、被検物質の毒性や薬効を
判定するための実験動物個体としては極めて有用である。しかしながら、この先
願発明のキメラマウスの場合には、ヒト肝細胞の移植から 50 日以上は生存する
ことができず、また成長の過程で正常化したマウス肝細胞が増殖するため、移植
ヒト肝細胞の増殖効率は低く、ヒト肝細胞の置換率は約 50% 程度にとどまって
30 いた。

このことはまた、最近のMercerらの報告（Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DF, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JRT, Tyrrell DLJ and Keteman NM. Hepatitis C virus replication
5 in mice with chimeric human livers. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. Nature Medicine 7:927-933, 2001）によっても裏付けられている。Mercerらは、この出願の発明者らと同様にしてuPA-Tg/SCIDを作製し、凍結保存したヒト肝細胞を融解して移植した結果、マウス血清中に2 mg/ml未満のヒトアルブミンが
10 検出され（血液中に換算すると約1 mg/ml未満）、肝臓の約50%がヒト肝細胞で置き換わったことを報告している。

以上のとおり、免疫不全肝障害マウス（uPA-Tg/SCIDマウス）にヒト肝細胞を移植してキメラマウスを作製することは、そのキメラマウス自体に有用性（例
15 えば、ヒト肝細胞に対する毒性や薬効のin vivo試験等）は存在するものの、マウス個体内で移植肝細胞を大量に増殖させるための手段としては、不十分であった。

また、ヒト肝細胞を移植したキメラマウスは長期間生存することができず、また成長の過程でマウス肝細胞が増殖してしまうため、ヒト肝細胞に対する毒性や
20 薬効の in vivo 評価系としてもその利用対象が限定されていた。

この出願の発明は、ヒト肝細胞の増殖方法として、マウス体内でヒト肝細胞を十分に増殖させるための改良された方法を提供することを課題としている。

25

また、長期間生存することによって、マウス体内で増殖したヒト肝細胞を分離回収する方法を提供することも課題としている。

さらに、分離したヒト肝細胞を複数のマウスに移植してマウス体内で増殖させることにより一定の規格のヒト肝細胞を体内に持つキメラマウスを大量に得るこ
30

と、そのマウスから分離した一定規格のヒト肝細胞を大量に得る方法を提供することも課題としている。

さらには、分離したヒト肝細胞の利用方法を提供することを課題としている。

- 5 またさらに、この出願は、前記の各発明を実施するために有用なモノクローナル抗体や、そのモノクローナル抗体を産生する新規ハイブリドーマ細胞株を提供することを課題としてもいる。

10

発明の開示

- この出願は、前記の課題を解決するための第1の発明として、免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態でヒト肝細胞移植マウスを飼育することにより、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で増殖させることを特徴とするヒト肝細胞増殖方法を提供する。
- 15

この第1発明の方法においては、ヒト補体の攻撃から防御させた状態が、以下の(a)および(b)：

- (a) ヒト肝細胞移植マウスに少なくとも1回、補体抑制剤を投与すること；
- 20 (b) 免疫不全肝障害マウスとして、免疫不全肝障害マウスと decay-accelerating factor (DAF/CD55)トランスジェニックマウスを交配して得られた子孫マウスを使用すること、
- の少なくとも一方であることを好ましい態様としている。

- 25 またこの第1発明の方法においては、免疫不全肝障害マウスが、遺伝的免疫不全マウスと遺伝的肝障害マウスとを交配して得られた子孫マウスであることを好ましい態様としている。さらに、この子孫マウスがヘミ接合体免疫不全肝障害マウスであること、そしてこのヘミ接合体免疫不全肝障害マウスに肝細胞増殖阻害物質を投与した後、ヒト肝細胞を移植することをそれぞれ好ましい態様としても
- 30 いる。

さらにこの第 1 発明およびその好ましい前記態様においては、ヒト肝細胞を移植した免疫不全肝障害マウスに抗マウス Fas 抗体を投与することを別の好ましい態様としている。

5

この第 1 発明の方法においては、また、免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植するヒト肝細胞が、増殖性ヒト肝細胞であること、その増殖性ヒト肝細胞が、増殖性ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識されたヒト肝細胞であること、そしてモノクローナル抗体が、Mouse-Mouse hybridoma
10 K8223 (FERM BP-8334) が産生するモノクローナル抗体であることをそれぞれ好ましい態様としている。

この出願は、第 2 の発明として、以下のステップ(1)～(3)：

- 15 (1) 免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態でヒト肝細胞移植マウスを飼育することによって、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で増殖させるステップ；
- (2) マウス肝臓から増殖したヒト肝細胞を単離するステップ；および
- (3) 単離したヒト肝細胞を、免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植し、ヒト肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態でヒト肝細胞移植マウスを 50
20 日以上飼育するステップ、
- からなり、ステップ(2)および(3)を 1 回以上繰り返すことを特徴とするヒト肝細胞大量増殖方法を提供する。

この第 2 発明の方法においては、ステップ(1)および／または(3)におけるヒト
25 補体の攻撃から防御させた状態が、以下の(a)および(b)：

- (a) ヒト肝細胞移植マウスに少なくとも 1 回、補体抑制剤を投与すること；
- (b) 免疫不全肝障害マウスとして、免疫不全肝障害マウスと decay-accelerating factor (DAF/CD55)トランスジェニックマウスを交配して得られた子孫マウスを使用すること、
30 の少なくとも一方であることを好ましい態様としている。

またこの第2発明の方法においては、前記ステップ(1)および／または(3)において、免疫不全肝障害マウスが、遺伝的免疫不全マウスと遺伝的肝障害マウスとを交配して得られた子孫マウスであること、子孫マウスがヘミ接合体免疫不全肝障害マウスであること、そして、このヘミ接合体免疫不全肝障害マウスに肝細胞増殖阻害物質を投与した後、ヒト肝細胞を移植することをそれぞれ好ましい態様としている。

さらにこの第2発明および前記の好ましい態様においては、前記ステップ(1)および／または(3)において、ヒト肝細胞を移植した免疫不全肝障害マウスに抗マウス Fas 抗体を投与することを別の好ましい態様としてもいる。

またさらに、この第2発明の方法においては、前記ステップ(1)および／または(3)において免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植するヒト肝細胞が、増殖性ヒト肝細胞であること、増殖性ヒト肝細胞がコロニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識されたヒト肝細胞であること、そしてモノクローナル抗体が Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM BP-8334) が産生するモノクローナル抗体であることをそれぞれ好ましい態様としている。

この第2発明の方法においては、さらに、前記ステップ(2)において、以下の(a)および(b)：

(a) マウス肝臓から分離した肝臓組織をコラゲナーゼ処理する；および

(b) 非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識された細胞を単離する、

の少なくとも一方を行うことによって、実質的にヒト肝細胞のみを単離することを好ましい態様としている。そして、この態様においては、モノクローナル抗体が Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM BP-8333) が産生するモノクローナル抗体であることをさらに好ましい態様としている。

この出願は、第 3 の発明として、前記の第 1 発明または第 2 発明の方法によって増殖させたヒト肝細胞を肝臓内に有するキメラマウスを提供する。

5 この第 3 発明のキメラマウスは、増殖したヒト肝細胞が肝臓内の細胞の 70% 以上を占めていること、および／またはヒト型 P450 活性を有することを好ましい態様としている。

この出願はさらに、第 4 の発明として、前記第 3 発明のキメラマウスの肝臓からヒト肝細胞を単離することを特徴とするヒト肝細胞取得方法を提供する。

10

第 4 発明の方法においては、以下の(a)および(b)：

- (a) マウス肝臓から分離した肝臓組織をコラゲナーゼ処理する；および
- (b) 非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識された細胞を単離する、

15 の少なくとも一方を行うことによって、実質的にヒト肝細胞のみを単離することを好ましい態様としている。そしてこの態様においては、モノクローナル抗体が Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM BP-8333) が産生するモノクローナル抗体であることをさらに好ましい態様としている。

20 この出願は、第 5 の発明として、前記第 4 発明の方法によって取得されたヒト肝細胞を提供する。

さらにこの出願は、第 6 の発明として、前記第 5 発明のヒト肝細胞を含む細胞キットを提供する。

25

さらにまた、この出願は、第 7 の発明として、前記第 5 発明のヒト肝細胞を充填したハイブリッド型人工肝臓を提供する。

さらにまた、この出願は、第 8 の発明として、非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。この第 8 発明の

30

一例は、Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM BP-8333) が産生するモノクローナル抗体である。

この出願はまたさらに、第 9 の発明として、前記第 3 発明のキメラマウスに候補物質を全身投与し、候補物質の薬物動態または毒性を試験する方法を提供する。

以上の各発明における態様や用語、概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、この発明の遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 等に記載されている。

図面の簡単な説明

図 1 は、補体抑制剤のヒトアルブミン濃度への効果を試験した結果である。

図 2 は、ヒト肝実質細胞と小型肝細胞をそれぞれ移植したマウスの血中アルブミン濃度を測定した結果である。

図 3 は、補体抑制剤のマウス体重に対する効果を試験した結果である。

図 4 は、キメラマウスに補体抑制剤を投与した時と投与していない時のヒト補体 (hC3a) 濃度の比較である。

図 5 は、マウス血中ヒトアルブミン濃度とヒト肝細胞による置換率および肝

機能の相関を示したグラフである。

図 6 は、ヒト特異的サイトケラチン 8/18 抗体による免疫染色像である。

5 図 7 は、ヒト特異的サイトケラチン 8/18 抗体による免疫染色の拡大像である。

図 8 は、ヒト肝細胞を移植したマウス肝臓マイクロゾームにおけるヒト特異的 CYP2CP のウェスタンブロット分析の結果である。

10

図 9 は、マウスまたはドナー肝臓のマイクロゾームにおける Diclofenac の代謝活性を示したグラフである。

図 10 は、様々なヒト肝細胞置換率のキメラマウス肝臓、および Rifampicin
15 を投与したキメラマウス肝臓における 6 種類のヒト型 P450 分子種の発現量を示したグラフである。

図 11 は、ヒト肝細胞を再移植したマウス血中ヒトアルブミン濃度を試験した結果である。

20

図 12 は、uPA(+ / +) / SCID マウスへの Retrorsine 投与の効果を試験した結果である。

図 13 は、ヒト肝細胞キメラマウスに抗マウス Fas 抗体を投与したマウス血中
25 のヒトアルブミン濃度を試験した結果である。

図 14 は、様々な年令の患者から採取した肝細胞を培養した時の増殖曲線である。

30 図 15 は、モノクローナル抗体を作るために抗原として用いた培養ヒト肝細胞

の位相差顕微鏡像である。

図 16 は、ハイブリドーマ培養上清 (K8223) の、ヒト肝細胞における反応性を蛍光抗体染色により観察した像である。

5

図 17 は、ハイブリドーマ培養上清 (No. 23) の、分離直後のヒト肝細胞表面における反応性を FACS により解析した結果である。

図 18 は、ハイブリドーマ培養上清 (No. 23) に反応した細胞集団 (R2) と
10 反応しなかった細胞集団 (R3) を分取し、培養した時の位相差顕微鏡像である。

図 19 は、ハイブリドーマ培養上清 (No. 23) の、継代培養ヒト肝細胞表面における反応性を FACS により解析した結果である。

15 図 20 は、ハイブリドーマ培養上清 (K8216) の、分離直後のヒト、マウス、ラット肝細胞表面における反応性を FACS により解析した結果である。

発明を実施するための最良の形態

20

第 1 発明のヒト肝細胞増殖方法は、ヒト肝細胞を免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植し、ヒト肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態でこのレシ
ピエントマウスを飼育することにより、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で増殖
させることを特徴とする。

25

前記の Mercer ら (Nature Medicine 7:927-933, 2001) は免疫不全肝障害マウス (uPA-Tg/SCID マウス) を作製し、凍結保存したヒト肝細胞を融解してマウスに移植した結果、肝臓の 50% 程度がヒト肝細胞で置き換わったことを報告している。しかしながら、Mercer らの作製したヒト肝細胞移植マウスは、移
30 植したヒト肝細胞の高い置換率が達成できていない。

第1発明の方法は、移植したヒト肝細胞が作る補体がマウス本体を攻撃することを防止することによって、ヒト肝細胞移植マウスを50日以上も生存させることを可能としている。そして、このように50日以上もマウスを生存させること
5 によって、マウス肝臓の細胞を、70%以上ヒト肝細胞に置換させることを可能とするものである。

ヒト補体の攻撃からレシピエントマウスを防御するための第1の具体的手段は、「補正抑制剤」をレシピエントマウスに投与することである。補体抑制剤と
10 しては、nafamostat mesilate (フサン[®]; 鳥居製薬)、gabexate mesilate (FOY[®]; 小野製薬)、comostat mesilate (フオイパン[®]; 小野製薬)、cobra venom factor (コブラ毒) 等を用いることができる。なお、これらの補体抑制剤は、細胞移植や臓器移植の際に使用される薬剤である。ただし、通常の移植術においては、補体抑制剤は、レシピエントの肝臓が産生する補体が移植細胞や移
15 植臓器を攻撃することを防ぐために使用される。一方、この発明においては、レシピエントマウスは肝障害のために自らは補体を産生しないと考えられるため、補体抑制剤は、移植したヒト肝細胞が産生する補体がレシピエントマウスを攻撃することを防ぐために使用される。

ヒト補体の攻撃からレシピエントマウスを防御するための第2の具体的手段は、レシピエントマウスとして、免疫不全肝障害マウスとhuman decay-accelerating factor (hDAF/CD55)トランスジェニックマウスとの交配により得られた子孫マウスを使用することである。hDAF/CD55トランスジェニックマウスは、腎臓、心臓、肺、肝臓等の内皮細胞表面においてhDAFを高発現して
25 おり、ヒト補体に対する耐性能を有することが報告されている (Murakami H, Takahagi Y, Yoshitatsu M, Miyagawa S, Fujimura T, Toyomura K, Shigehisa T, Shirakura R, and Kinoshita T. Porcine MCP gene promoter directs high level expression of human DAF (CD55) in transgenic mice. Immunobiology, 201:583-597, 1999/2000; van Denderen BJW, Pearse
30 MJ, Katerelos M, Nottle MB, Du Z-T, Aminian A, Adam WR, Shenoy-

Scaria A, Lublin DM, Shinkel TA, and D'Apice AJF. Expression of functional decay-accelerating factor (CD55) in transgenic mice protects against human complement-mediated attack. *Transplantation*, 61:582-588, 1996)。従って、この hDAF/CD55 トランスジェニックマウスと免疫不全肝障害マウスとの子孫動物であるレシピエントマウスは、移植ヒト肝細胞の産生するヒト補体に対して高い耐性能を有している。hDAF/CD55 トランスジェニックマウスは、前記の文献 (*Immunobiology*, 201:583-597, 1999/2000 および *Transplantation*, 61:582-588, 1996) に従い、例えば広く様々な組織、器官で発現している membrane cofactor protein (MCP) や H2K (b) (MHC class I) のプロモーター制御下で hDAF が発現するように構築したベクターを用いて、公知のトランスジェニックマウス作製法 (例えば、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77;7380-7384, 1980) により作製することができる。

第1発明のヒト肝細胞増殖方法に使用する「免疫不全肝障害マウス」は、マウス本来の肝細胞が障害を受けている「肝障害マウス」であり、かつ、異種動物由来の細胞に対して拒絶反応を示さない「免疫不全マウス」である。従って、免疫不全肝障害マウスは、肝障害誘発処置と免疫不全処置とを同一マウス個体に施すことによって作製することができる。肝障害誘発処置は、例えば公知の肝障害誘発物質 (例えば、四塩化炭素、D-ガラクトサミン、2-アセチルアミノフルオレン、ピロロジンアルカロイドなど) による処理、あるいは外科的な肝切除等である。また、免疫不全処置としては、免疫抑制剤の投与や胸腺摘出等である。

ただし、この第1発明の方法では、遺伝的な肝障害形質を有するマウスと遺伝的に免疫不全であるマウスとを交配し、その子孫個体として得られた免疫不全肝障害マウスを使用することを好ましい態様としている。遺伝的肝障害マウスとしては、前記 Rhim ら (*Science*, 263, 1149 (1994)) が作成した uPA-Tg マウスを例示することができる。あるいは肝障害を生じさせる遺伝子 (例えば、tissue-type plasminogen activator 遺伝子等) を用い、公知のトランスジェニック法 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77;7380-7384, 1980) によりトランスジェニック免疫不全肝障害マウスを作成することもできる。また、肝機能を担う遺

伝子（例えば、フマリルアセト酢酸ヒドラーゼ遺伝子等）を公知のジーンターゲティング法（Science 244:1288-1292, 1989）によってノックアウトすることによっても、遺伝的な肝障害を有するマウスを得ることができる。一方、遺伝的な免疫不全マウスとしては、SCID マウス、NUDE マウス、RAG2 ノックアウト
5 マウス等の公知のマウスを使用することができる。以下、このようにして得られたマウスを「遺伝的免疫不全肝障害マウス」と記載する。

遺伝的免疫不全肝障害マウスは、肝障害遺伝子がホモ接合体であるマウスを用いることが好ましい。このようなホモ接合体マウスは正常な肝細胞がほとんど増殖しないため、ヒト肝細胞の増殖をマウス肝細胞が妨げることがない。ただし、
10 このようなホモ接合体マウスは、ヘミ接合体同士を掛け合わせた場合、確率的に 1/4 の割合でしか得ることができない。

一方、肝障害遺伝子がヘミ接合体である遺伝的免疫不全肝障害マウス（「ヘミ接合体免疫不全肝障害マウス」）は、ヘミ接合体同士を掛け合わせた場合、またはヘミ接合体と SCID マウスを掛け合わせた場合 1/2 の確立で得ることができるため、第 1 発明の低コストでの実施が可能となる。しかし、ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスは、2 倍体染色体の一方の遺伝子が正常であるため、肝障害遺伝子の欠失により正常肝細胞がコロニーを形成しながら増殖して生後 7 週頃にはマウス肝臓を正常なマウス肝細胞が占めるようになる。このため、一般的には、ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスはヒト肝細胞を増殖させるためのレシピエントマウスとして適さない。そこでこの第 1 発明の好ましい態様として、ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスにヒト肝細胞を移植する前に、肝細胞特異的に増殖を阻害する物質を投与し、正常化したマウス肝細胞が増殖してコロニーを形成することを予防する。肝細胞増殖阻害物質としては、たとえば pyrrolizidine alkaloid の一種である retrorsine、lasiocarpine、seneciophylline、monocrotaline、trichodesmine 等を例示することができる。
20
25

第 1 発明の方法において、移植に用いるヒト肝細胞は、正常なヒト肝組織から
30 常法によって単離したものをを用いることができる。この第 1 発明の方法において

は、特に *in vivo* で活発な増殖能を有する増殖性肝細胞を使用することを好ましい態様としている。なおこの発明において、「増殖性ヒト肝細胞」とは、培養条件下 (*in vitro*) において、単一細胞種の集団としてのコロニーを形成し、そのコロニーを増大させるように増殖するヒト肝細胞を意味する。また、その増殖は、コロニー構成細胞が単一種であるという点において「クローン性増殖」という場合もある。さらに、このような細胞は、継代培養によって細胞数をさらに増加することができる細胞である。

このような増殖性ヒト肝細胞は、一例として、この出願の発明者らが発明したヒト小型肝細胞を用いることができる。すなわち、この出願の発明者は、ラットあるいはヒトの肝臓に増殖能の高い小型肝細胞が含まれることを見いだし、すでに特許出願している（特開平 08-112092 号公報；日本特許第 3266766 号；米国特許第 6,004,810 号、特開平 10-179148 号公報；日本特許第 3211941 号、特開平 7-274951 公報；日本特許第 3157984 号、特開平 9-313172 号公報；日本特許第 3014322 号）。また、関連の論文も発表している（Chise Tateno, and Katsutoshi Yoshizato: Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells. *American Journal of Pathology* 149:1593-1605, 1996. Hiroshi Hino, Chise Tateno, Hajime Sato, Chihiro Yamasaki, Shigeru Katayama, Toshihiko Kohashi, Akio Aratani, Toshimasa Asahara, Kiyohiko Dohi, and Katsutoshi Yoshizato: A long-term culture of human hepatocytes which show a high growth potential and express their differentiated phenotypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 256: 184-191, 1999. Chise Tateno, Kaori Takai-Kajihara, Chihiro Yamasaki, Hajime Sato, and Katsutoshi Yoshizato: Heterogeneity of growth potential of adult rat hepatocytes *in vitro*. *Hepatology* 31: 65-74, 2000. Shigeru Katayama, Chise Tateno, Toshimasa Asahara, and Katsutoshi Yoshizato: Size-dependent *in vivo* growth potential of adult rat hepatocytes. *American Journal of Pathology* 158: 97-105, 2001.)。このヒト小型肝細胞は、その優れた増殖能によって、

レシピエントの体内で急速に増殖し、正常な肝機能を発揮しうるヒト肝細胞集団を短時間で形成することができる。

このような小型肝細胞の採取は、前記の先願発明に記載されているような遠心
5 分離を用いた方法の他、エルトリエーターや FACS 等の細胞分画装置によっても採取することができる。さらには、コロニーを形成しながら増殖する肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって採取することもできる。in vitro で増殖させたヒト肝細胞、凍結保存肝細胞、テロメラーゼ遺伝子等の導入により不死化させた肝細胞、これらの肝細胞と非実質細胞を混合させたものでも可能で
10 ある。

増殖性ヒト肝細胞の別の例は、増殖性ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体（実施例 6）によって認識されたヒト肝細胞である。このようなモノクローナル抗体が認識する増殖性ヒト肝細胞は、抗体への標識に応じて、公知の
15 EIA、RIA、蛍光抗体法等により高純度で得ることができる。具体的には、例えば、ヒト肝臓から分離した肝細胞集団に、酵素、放射性同位体、磁気ビーズ、または蛍光色素等で標識したモノクローナル抗体を接触させ、標識シグナルを発する細胞を単離することによって行うことができる。標識として使用する酵素は、turnover number が大であること、抗体と結合させても安定であること、基質
20 を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば特段の制限はなく、通常 EIA に用いられる酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素と
25 抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジシンを、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。放射性同
30 位体としては、 ^{125}I や ^3H 等の通常の RIA で用いられているものを使用するこ

とができる。蛍光色素としては、フルオレッセンスイソチオシアネート (FITC) やテトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) 等の通常の蛍光抗体法に用いられるものを使用することができる。また、標識シグナルの検出は、酵素を用いる場合には酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。放射生同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンタ等により測定する。また、蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

10

以上のとおりのヒト肝細胞、とくに増殖性ヒト肝細胞を免疫不全肝障害マウスに移植するには、実施例に示したように、マウスの脾臓を経由して肝臓へ移植することができる。また、直接門脈から移植することも可能である。移植するヒト肝細胞の数は、1～10000 個程度とすることができる。

15

さらにこの第1発明の方法では、ヒト肝細胞を移植したマウスに、抗マウス Fas 抗体を投与することを好ましい態様の一つとしている。抗マウス Fas 抗体は、マウス肝細胞の Fas 抗原に反応し、アポトーシスを誘導する作用を持つ。ヒト肝細胞を移植したマウスに抗マウス Fas 抗体を投与することにより、マウスの肝細胞はアポトーシスを起こし、死滅する。この抗体はヒト肝細胞には影響を与えないため、移植したヒト肝細胞のみが選択的に増殖することができる。この方法により、マウス肝臓におけるヒト肝細胞による置換率をさらに上昇させることが可能となる。

20

25 次に、第2発明のヒト肝細胞大量増殖方法について説明する。

第2発明の方法は、以下のステップ(1)～(3)を行うことを特徴とする。

ステップ(1)：第1発明の方法と同様にしてヒト肝細胞をマウス肝臓内で増殖させる。

30 ステップ(2)：マウス肝臓内で増殖したヒト肝細胞を単離する。

ステップ(3)：単離したヒト肝細胞を、免疫不全肝障害マウスにそれぞれ移植し、第1発明の方法と同様にしてヒト肝細胞を増殖させる。

そして、この第2発明の方法は、前記ステップ(2)および(3)を1回以上繰り返す。すなわち、ステップ(1)において1匹のマウスに移植したヒト肝細胞は、そのマウス肝臓内で約100倍まで増加する。従って、ステップ(2)において増殖ヒト肝細胞が全て回収されれば、ステップ(3)においては、原理的には、100匹のマウスにヒト肝細胞を移植することができ、最終的には、最初に移植したヒト肝細胞の100×100倍のヒト肝細胞を回収することができる。さらに、ステップ(2)および(3)を2回繰り返すことによって、最初に移植したヒト肝細胞の100×100×100倍のヒト肝細胞を回収することができる。

この第2発明の方法では、ステップ(1)および／またはステップ(3)を前記の第1発明方法またはその好ましい態様方法と同一に行うことができる。ここで、「および／または」とは、前記第1発明方法における1つの要件を、ステップ(1)でのみ行ってもよく、ステップ(3)でのみ行ってもよく、あるいはステップ(1)および(3)の両方で行ってもよいことを意味する。例えば、ステップ(1)では、前記のモノクローナル抗体(第8発明)によって認識されたヒト増殖性肝細胞をマウスに移植し、ステップ(3)では回収されたヒト肝細胞の全てを移植用として使用するようにしてもよい。前記第1発明における各要件は、ヒト肝細胞を増殖させたマウス個体、またはマウスから回収したヒト肝細胞の用途等に応じて、適宜に選択して行うことができる。

第2発明のステップ(2)は、ステップ(1)〔ステップ(2)および(3)を繰り返す場合は、その直前のステップ〕において増殖させたヒト肝細胞をマウス肝臓から単離するステップである。分離方法は様々な方法(例えば、コラゲナーゼ灌流法等)を採用することができるが、以下の方法(a)および(b)の少なくとも一方を行うことが好ましい。

方法(a)：

マウス肝臓から分離した肝臓組織をコラゲナーゼ処理することによって、実質

的にヒト肝細胞のみを回収する。コラゲナーゼの細胞毒性は、マウス肝細胞に対する方がヒト肝細胞に対するより高いため、コラゲナーゼによる消化時間を調節することにより、マウス肝細胞にダメージを与え、ヒト肝細胞のみを分取することもできる。コラゲナーゼ処理の時間は、ヒト肝細胞とマウス肝細胞との割合によっても異なるが、例えば、ヒト肝細胞が 70% 以上の場合は、8~20 分間程度の処理を行えばよい。

方法(b) :

10 非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体 (第 8 発明) によって認識された細胞を単離することによって、純度の高いヒト肝細胞を回収する。このようなモノクローナル抗体としては、Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM P-18751) が産生するモノクローナル抗体を例示することができる。

15 この出願の第 3 発明は、前記の第 1 発明または第 2 発明の方法によって増殖させたヒト肝細胞を肝臓内に有する「キメラマウス」である。このキメラマウスは、好ましくはヒト肝細胞の移植から 50 日以上、さらに好ましくは 70 日以上生存したマウスである。またこのキメラマウスは、マウス肝臓の 70% 以上、好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 98% 以上がヒト肝細胞で占められているマウスである。またさらに、このキメラマウスは、ヒトのシトクロム P450 活性を有するマウスである。すなわち、ヒト型 P450 は CYP1A1、1A2、2C9、2C19、2D6、3A4 等、数十種類の分子種が存在するが、この発明のキメラマウスは、これらのヒト型 P450 をそれぞれヒト肝細胞と実質的に同程度に発現していることを特徴の一つとしている。シトクロム P450 は肝臓における外来性化学物質の代謝等に関与するタンパク質であり、ヒト型 P450 を発現するマウス肝臓は、ヒト肝臓と実質的に同様にして化学物質等を代謝する。従って、この第 3 発明のキメラマウスは、例えば薬剤の薬効や毒性がヒト肝細胞に及ぼす影響を試験する方法 (第 9 発明) を可能とする。なお、このようなキメラマウスの利用は、この出願の発明者らによる先願発明 (特開 2002-45087 号公報: キメラ動物) を参照することができる。また、第 2 発明の大量増殖方法によって増殖させたヒト肝

20

25

30

細胞を肝臓内に有するキメラマウスの集団は、同一のヒト由来の肝細胞をそれぞれに有するキメラマウスの集団であり、大規模な試験を実質的に均一な条件で行うことを可能にする。

- 5 この出願の第4発明は、前記第3発明のキメラマウスからヒト肝細胞を単離する方法である。この方法は、前記第2発明のステップ(2)と同様にして行うことができる。

- 10 この出願の第5発明は、前記第4発明の方法によってキメラマウスの肝臓から単離したヒト肝細胞である。このヒト肝細胞は、マウス個体内で増殖したことによって、実質的にヒト肝臓組織の正常肝細胞と同一の肝機能を有している。従って、この第5発明のヒト肝細胞によって、薬物代謝試験や安全性試験などに用いることができるヒト肝細胞キット（第6発明）や、ハイブリッド型人工肝臓（第7発明）が提供される。さらに、ハイブリッド型人工肝臓に使用するモジュール
15 （ヒト肝細胞を充填したモジュール）を使用して、ヒト肝細胞が生産する有用物質を回収することができる。

- 20 肝細胞キットは、細胞の種類や用途に応じて各種のもの公知であり、当業者であれば、第5発明のヒト肝細胞と公知の細胞キットの構成を採用することによって、第6発明の細胞キットを容易に作製することができる。また、モジュールやハイブリッド型人工臓器の構成も公知であり、当業者であれば第7発明の人工肝臓等を容易に作製することができる。

- 25 この出願は、さらに第8の発明として、非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。

- 30 このモノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体作製法（「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990年；"Monoclonal Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996）に従い、例えば以下の様な手順で作製することができる。

1 : ハイブリドーマ細胞の作製

継代培養したヒト正常肝細胞を含む免疫原を用いて哺乳動物を免疫し、必要に応じて適宜に追加免疫して動物を十分に感化する。次いでこの動物から抗体産生細胞（リンパ細胞または脾臓細胞）を摘出し、これとミエローマ（骨髓種）細胞株との融合細胞を得る。そして、これらの融合細胞株から、目的とするモノクローナル抗体を産生する細胞を選択し、培養することによって、ハイブリドーマ細胞を得ることができる。以下、各工程を詳しく説明する。

10 a) 免疫原の調製

正常肝組織からコラゲナーゼで分離したヒト肝細胞を継代培養し、免疫原とする。ヒト肝細胞は、4回以上、好ましくは6回以上の継代が可能な、例えば15歳以下のヒト肝組織から分離したものを使用することが好ましい。

15 b) 動物の免疫

被免疫動物としては、公知のハイブリドーマ作製法に用いられる哺乳動物を使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等である。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点からは、マウスまたはラットを被免疫動物とするのが好ましい。また、実際に使用するマウスおよびラットの系統は特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統 A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、RⅢ、SJL、SWR、WB、129 等が、またラットの場合には、たとえば、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer 等を用いることができる。このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスでは BALB/c 系統が、ラットでは low 系統が被免疫動物として特に好ましい。なお、これらマウスまたはラットの免疫時の週齢は5～12週齢が好ましい。

動物の免疫は、免疫原である継代ヒト肝細胞を、 $10^4 \sim 10^8$ 個程度、動物の皮内または腹腔内に投与することによって行うことができる。免疫原の投与スケジュールは被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数

30

1～6回、複数回の場合は投与間隔 1～2 週間が好ましい。

c) 細胞融合

上記の投与スケジュールの最終免疫日から 1～5 日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞またはリンパ細胞を無菌的に取り出す。これらの脾臓細胞またはリンパ細胞からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法に従って行うことができる。

次いで、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合する。このミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜に選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立している HGPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 欠損株を用いるのが好ましい。すなわち、マウス由来の X63-Ag8(X63)、NS1-Ag4/1(NS-1)、P3X63-Ag8.U1(P3U1)、X63-Ag8.653(X63.653)、SP2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7(45.6TG)、FO、S149/5XXO, BU.1 等、ラット由来の 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3)等、ヒト由来の U266AR(SKO-007)、GM1500・GTG-A12(GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41)等である。

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。そのような方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。

融合細胞と非融合細胞の選択は、例えば、公知の HAT (ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン) 選択法により行うのが好ましい。この方法は、アミノプテリン存在下で生存し得ない HGPRT 欠損株のミエローマ細胞を用いて融合細胞を得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞および融合細胞を HAT 培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせた融合細胞のみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

d) ハイブリドーマのスクリーニング

目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングは、公知の酵素免疫検定法（EIA：Enzyme Immunoassay）、放射線免疫測定法（RIA：Radio Immunoassay）、蛍光抗体法等により行うことができる。

5 このようなスクリーニングによって、非ヒト肝細胞とは結合せず、ヒト肝細胞のみと特異的に結合するモノクローナル抗体をそれぞれに産生するハイブリドーマ細胞群が得られる。

なお、スクリーニング後のハイブリドーマ細胞は、メチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法によりクローニングし、抗体産生に用いる。

10 以上の通りの方法によって得たハイブリドーマ細胞は、液体窒素中または-80℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。この出願は、このようなハイブリドーマ細胞の具体例として、Mouse-Mouse hybridoma K8216（FERM BP-8333）を提供する。

15 2：モノクローナル抗体の取得および精製

上記1で作製したハイブリドーマ細胞を公知の方法で培養することによって、非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞のみと特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。

20 培養は、例えば、前記のクローニング法で使用した同じ組成の培地中で培養してもよく、あるいはモノクローナル抗体を大量に産生するためには、マウス腹腔内にハイブリドーマ細胞を注射し、腹水からモノクローナル抗体を採取してもよい。

25 このようにして得たモノクローナル抗体は、例えば硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等により精製することができる。

この出願は、モノクローナル抗体の具体例として、前記のハイブリドーマ（Mouse-Mouse hybridoma K8216）が産生するモノクローナル抗体を提供する。

30 この第8発明のモノクローナル抗体は、前記第2発明および第4発明の方法

において、マウス肝臓からヒト肝細胞のみを分離するために使用することができる。また、この第 8 発明のモノクローナル抗体は、非ヒト肝細胞は認識しないため、マウス以外の非ヒト動物の体内でヒト肝細胞を増殖させた場合、あるいは非ヒト肝細胞とヒト肝細胞を混合培養した場合に、ヒト肝細胞を単離、精製する
5 ために使用することができる。

なお、この出願の発明で使用する「増殖性ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体」も、スクリーニング工程において目的抗体を産生するハイブリドーマを選択することを除き、前記と同一の方法で作成することができる（実施
10 例 6 参照）。この出願は、そのようなモノクローナル抗体の具体例として、Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM BP-8334) が産生するモノクローナル抗体を提供する。

15

実施例

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

20

実施例 1

ヒト肝細胞を増殖させたキメラマウスの作成

免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、肝臓内でヒト肝細胞を増
25 殖させたキメラマウスを作製した。作成の材料、方法、および各種試験の結果は以下のとおりであった。

1 材料

30 (a) アルブミンウロキナーゼプラスミノーゲンアクティベータートランスジェ

ニックマウス

(uPA-Tg):B6SJL-TgN (Alb1Plau) 144Bri

(b) スキッドマウス (Scid): C. B-17/Icr Scidjcl

(c) nafamostat mesilate

5 (d) retrorsine レトロルシン

(e) ヒト肝細胞

なお、マウス(a)は The Jackson Laboratory、マウス(b)は日本クレアよりそれぞれ購入した。薬品(c)は鳥居製薬社製（商品名：フサン）、(d)は SIGMA 社製を購入した。

- 10 また、細胞(e)は以下のとおりに調製した。肝切除術を行う患者にインフォームドコンセントを実施し、承諾を得た後に切除肝より正常肝臓組織を得て、UW液で灌流し、4℃で運搬した。正常肝臓組織からコラゲナーゼ処理により肝臓分散液を得た。低速遠心分離法（50g、2分）で沈殿と上澄みに分離し、それぞれに含まれる細胞（上澄み：小型肝細胞、沈殿：肝実質細胞）を培地で洗浄後、肝
- 15 細胞数をカウントした。凍結保存する場合は、凍結保存液（クラボウ製）を加え、プログラムフリーザーを用いて凍結した。液体窒素に保存してある沈殿または上澄みの肝細胞を 37℃の恒温水槽で融解し、細胞数をカウントした。4 x 10⁷ 個/ml になるように、移植直前に培地で調整した。

20 2 方法と結果

2.1 免疫不全肝障害マウスの作製

uPA-Tg マウス(hemizygote, +/-)と SCID マウス (homozygote, +/-) を掛け合せ、両方の形質を持つマウス Tg(+/-)/SCID(+/-)を 35.2%の確率で得た。

- 25 Tg(+/-)と Tg(-/-)の識別は、Tg 遺伝子に特異的な配列をプライマーに用い、ゲノム PCR 法により行った。また、SCID(+/-)と SCID(-/-)の識別は、PCR-RFLP 法により行った。

次に、得られた Tg(+/-)/SCID(+/-)を SCID(+/+)と戻し交配させ、Tg(+/-)/SCID(+/+)を得た。その結果、Tg(+/-)は 37.9%出現し、SCID(+/+)は 52.8%

- 30 出現した。Tg(+/-)/SCID(+/+)同士を交配させ、目的の Tg(+/-)/SCID(+/+)およ

び Tg(+ / +) / SCID(+ / +) を得た。

なお、uPA 遺伝子のホモとヘテロの識別は以下の方法で行った。

生後 8 ~ 10 日目のマウスの尾を約 5 mm 切断し、Qiagen DNeasy Tissue Kit を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA の濃度および純度を吸光度計を用いて測定した。master mix 25 μ l, primer F 1 μ l, primer R 1 μ l, Taqman probe 1 μ l に DNA と蒸留水を加え、全量を 50 μ l に調整し、定量性 PCR を行った (ABI7700, Sequencer Detector, PE Applied Biosystems)。プライマーおよび Taqman probe は uPA 遺伝子導入のためのベクターに含まれるヒト成長ホルモンのコード配列を対象として以下のとおりに設計した。

10 primer F : gtcttgctcgtcgcaatc (SEQ ID No: 1)

primer R : cgggagactgaggcaggag (SEQ ID No: 2)

Taqman probe : ccgcctcctgggttcaagcga (SEQ ID No: 3)

またとコントロールとして、マウス G3PDH を対象とする以下のプライマーおよび Taqman probe を用いた。

15 primer F : ggatgcagggatgatgttc (SEQ ID No: 4)

primer R : tgcaccaccaactgcttag (SEQ ID No: 5)

Taqman probe : cagaagactgtggatggccctc (SEQ ID No: 6)

PCR 条件は、95℃で 10 分変性の後、95℃で 15 秒変性と 60℃で 1 分伸長を 50 サイクル行った。ヒト成長ホルモンのコード配列の増幅断片の量を、内部コントロールのマウス G3PDH コード配列の増幅断片量で割った相対値により、ゲノム DNA 中の導入遺伝子の量を比較した。標準曲線はサンプルの中のヘテロかホモのマウスのゲノムの希釈系列を用いた。標準に用いたマウスの値を 1 とし、そのマウスがヘテロだった場合は、ヘテロが 1 に近い数値を示し、ホモは 2 に近い数値を示す。標準に用いたマウスがホモだった場合は、ホモが 1 に近い数値を示し、ヘテロは 0.5 に近い数値を示す。解剖時の肉眼所見により、この方法による正答率は約 90% と推定している。

2.2 uPA-Tg/SCID マウスへのヒト肝細胞の移植

生後 14 ~ 48 日目の Tg(+ / +) / SCID(+ / +) マウスをエーテルで麻酔し、脇腹を約 5 mm 切開し、脾頭より $4-8 \times 10^7$ 個 / ml の濃度の細胞懸濁液を 10-12.5 μ

1 ずつ ($4-10 \times 10^5$ 個) 注入した後、止血した。腹腔に止血剤 e-aminocaproic acid (SIGMA) を 0.02 g/ml の濃度で 40 μ l ずつ投与し、脾臓を腹腔に戻し縫合した。Tg マウスの肝細胞で作られた uPA は細胞外へ分泌されるため、血中の uPA 濃度が高い。uPA は、蛋白質分解や plasminogen から plasmin への活性化を触媒したり、fibrin clot を分解する働きがある。このため、生後、多くの
5 マウスが、腸管や腹腔内で出血をおこし生後 4 日以内に死に至るといわれている。手術時の出血による死亡を避けるため、plasminogen activator および plasmin の作用を阻止し止血作用の効果を有する e-aminocaproic acid を投与した。

- 10 掛け合わせに用いた SCID/C.B-17 マウスは、T 細胞 B 細胞は持たないが、NK 細胞を持つことが知られている。そこで、移植したヒト肝細胞がマウスの NK 細胞に攻撃されないように、NK 活性を阻害する asialo GM1 抗体を移植前日と移植翌日に腹腔内に投与した。生後 4 週で離乳させ、生後 5 週から雌雄を別ケージで飼育した。

15

2.3 マウス血中におけるヒトアルブミンのモニタリング

ヒト肝細胞移植後 1 週間目より、週 1 回または 2 回ずつマウスの尾より血液を 10 μ l 採血し、ヒトアルブミン濃度を Quantitative ELISA immunoassay (Bethyl laboratories Inc.) を用いて測定した。

- 20 ヒト肝細胞を移植した 19 匹の Tg(+)/SCID マウス中 11 匹のマウス血中でヒトアルブミンが増加し (図 1)、高いもので、8 mg/ml 以上に達し、この値はマウス血中アルブミンの 62% に相当した。

また、ヒト肝細胞の低速遠心分離による上澄み中の細胞 (小型肝細胞) と沈殿中の細胞 (肝実質細胞) をそれぞれ移植した場合の血中ヒトアルブミン濃度を比較したところ、肝実質細胞移植マウスよりも小型肝細胞移植マウスの方がアルブ
25 ミン濃度の上昇を示した (図 2)。

2.4 ヒト肝細胞により産生されるヒト補体および補体抑制剤の投与

- 血中ヒトアルブミンが 3 mg/ml を越えたマウスが急速に状態が悪くなり死亡
30 するケースが見られた (図 1)。死亡動物には肺の出血が観察され、ヒト肝細胞

による補体産生による影響が認められた。マウス肝臓組織中のヒト肝細胞をヒト補体 C3 に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、ヒト肝細胞に C3 の存在が確認された。そこで、ヒトアルブミン濃度が高くなったマウスに 2 mg/ml 濃度の補体抑制剤（フサン）200 μ l を投与した。投与頻度は 2 日に 1 回から開始した。体重の変化を毎日観察し、体重減少が見られたら、投与頻度や濃度を増加していった（図 3）。その結果、血中ヒトアルブミン濃度が 2 mg/ml を越えたマウスには補体抑制剤（フサン）を隔日、4 mg/ml を越えたマウスには毎日、さらに 6 mg/ml を越えたマウスには 1 日 2 回投与することとした（図 3）。この処理により、血中ヒトアルブミン濃度が 3 mg/ml を越えてもマウスが長期間生存でき、高いもので 8 mg/ml のヒトアルブミンを検出できるようになった（図 1）。

さらに、補体抑制剤（フサン）を投与しないキメラマウスと、投与したキメラマウスのそれぞれの血中ヒト補体（hC3a）を ELISA 法により測定した。その結果、補体投与キメラマウスの hC3a 濃度は、非投与キメラマウスに比較して低いことが確認された（図 4）。

2.5 ビタミン C および SCID マウス血清の投与

ヒト肝細胞はビタミン C を合成できないため、ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスはビタミン C 欠乏症となる可能性が考えられた。そのため、ヒト肝細胞を移植したマウスには ascorbic acid 2-phosphate を 1 mg/ml の濃度で溶かした飲料水を与えた（日本クレア、アスコルビン酸合成能欠如ラットの飼育方法を参考にした）。

また、ヒト肝細胞を移植した Tg(+/-)/SCID マウスは Tg(+/-)/SCID マウスに比べて体重増加が遅く毛並みも悪い。マウス肝臓中のヒト肝細胞が合成する蛋白や酵素などがマウスの成長や体の維持に不十分である可能性が考えられたので、SCID マウス血清を 50 μ l ずつ週に 1 回皮下に投与した。SCID マウス血清を投与したものと投与していない Tg(+/-)/SCID マウスの体重増加量を比較したところ、投与したマウスの方が上回った。

2.6 マウス肝臓の肉眼的病理検査および組織学的病理検査

マウスをエーテル麻酔下で採血し、血清中アルブミンおよび GPT 値を測定した。肝臓と脾臓を摘出し、重量測定、写真撮影後に凍結切片ブロック、パラフィン切片ブロック用にサンプリングし、残りのサンプルからマイクロソーム画分を抽出した。ヒトアルブミン濃度が高くなるに従って、血清アルブミン量の増加および GPT 値の低下が認められた（図 5）。

ヒトアルブミンが高値のマウスでは、肝臓全体が桃色を呈し、1 部に Tg(+ / +) / SCID の特徴である白色部位が残っているマウスも見られた。また、1 部が赤色を呈した肝臓も見られ、その部位は uPA 導入遺伝子の欠損により正常化したマウスの肝細胞と考えられた。

- 10 肝臓のそれぞれの葉の凍結切片を作製し、ヒト特異的 cytokeratin 8 / 18 抗体 (ICN Pharmaceuticals, Inc, Ohio) を反応させた後、Peroxidase 標識 DAKO Envision⁺™ (DAKO CORPORATION, CA) で染色した。それぞれの葉について、切片面積あたりの cytokeratin 8 / 18 陽性部位の割合を算出した（図 6、7）。ヒトアルブミン分泌量が多いマウスでは、cytokeratin 8 / 18 陽性肝細胞の面積
- 15 の割合が高かった。陽性細胞が 80% を越えているマウスも観察された。

2.7 マイクロソームにおける P450 分子種の解析

- マウスから採取したマイクロソーム画分における P450 分子種の発現を、P450 の分子種に対する抗体（第一化学薬品株式会社、東京）を用いてウェスタンブロット分析により検出した。その結果、ヒトアルブミンが高かったマウスにおいて、P450 のヒト特異的な分子種である CYP2C9 の発現が認められた（図 8）。

- さらに、マウスから採取したマイクロソーム画分における CYP2C9 の活性を調べるため、マイクロソームに Diclofenac を添加し、Diclofenac 4-
- 25 hydroxylation の測定を行った。その結果、uPA(- / -) SCID マウスには Diclofenac 4-hydroxylation 活性はほとんど認められず、補体抑制剤投与による誘導も認められなかった。一方、ヒト肝細胞を移植したキメラマウスにおいては、ヒト細胞への置換率が高くなるほど高い Diclofenac 4-hydroxylation 活性が認められ、置換率 89% のキメラマウスでは、ドナー（ヒト）のマイクロソーム
- 30 ムにおけるそれを上回る活性が認められた（図 9）。

2.8 キメラマウス肝臓における P450 各分子種の mRNA 発現と、

Rifampicin による誘導

キメラマウス肝臓より total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成
5 した。6 種類のヒト型 P450 分子種 (CYP1A1、1A2、2C9、2C19、2D6、
3A4) のそれぞれの遺伝子 cDNA に対するプライマーを合成し、PRISM 7700
Sequence Detector (ABI 社) を用いて、それぞれの mRNA 発現量を定量した。
その結果、置換率 0% のコントロールマウスがヒト型 P450 をほとんど発現しな
いのに対し、キメラマウス肝臓においては全てのヒト型 P450 分子種が発現して
10 おり、それらの発現パターンはドナー (ヒト) の発現パターンと近似していた
(図 10)。

さらに、キメラマウス 3 匹に Rifampicin (50 μ g/kg b.w.) を 4 日間腹腔内
投与し、5 日目に肝臓を採取し、前記と同様にして 6 種類のヒト型 P450 のそれ
ぞれの発現を定量した。Rifampicin はヒトの CYP3A4 発現のみを誘導すること
15 が公知である。その結果、Rifampicin を投与したキメラマウスの肝臓において、
非投与マウスに比べ約 5.7 倍ものヒト型 CYP3A4 発現が確認された (図 10)。

実施例 2

20 キメラマウスからのヒト肝細胞の分離と、
モノクローナル抗体によるヒト肝細胞純化

実施例 1 で作成したキメラマウスからコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離
した。コラゲナーゼの濃度は 0.05%、処理時間は 9 分とした。肝細胞には、ヒ
25 ト肝細胞とマウス肝細胞が混入していると考えられるが、マウス肝細胞の方がヒ
ト肝細胞に比べて、コラゲナーゼによる毒性が高いため、分離した肝細胞の多く
(約 80%) はヒト肝細胞により占められていた。

さらに、ヒト肝細胞の純度を上げるため、マウス肝細胞は認識せずに、ヒト肝
細胞の表面を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 (実施例 6 で作成した
30 ハイブリドーマ K8216 が産生するモノクローナル抗体) を用いてヒト肝細胞の

みを分離した。コラゲナーゼ灌流により分離したヒト肝細胞の占める割合が約 80%であったマウスの肝細胞に上記抗体を反応させ、さらに FITC 標識マウス IgG 抗体を反応させ、FACS を用いて FITC 標識マウス IgG 抗体に反応した細胞を分離した。その結果、ヒト肝細胞の純度が 95%以上となった。

5

実施例 3

キメラマウスから単離したヒト肝細胞の **uPA-Tg/SCID** マウスへの再移植

- 10 実施例 2 で単離した肝細胞を、実施例 1 と同様にして別の **uPA-Tg(+)/SCID** マウスに移植し、飼育した。その結果、マウス血中においてヒトアルブミン量の増加が見られた (図 11)。

15

実施例 4

uPA 導入遺伝子の欠失による正常化マウス肝細胞の増殖抑制

- 20 **uPA-Tg(+/-)/SCID** マウスおよび **uPA-Tg(+)/SCID** マウスに、**retrorsine** 30 または 60 mg/kg を腹腔内投与した。その結果、**uPA-Tg(+/-)/SCID** マウスにおける **uPA** 導入遺伝子の欠失 (**uPA-Tg(-/-)/SCID**) による正常化肝細胞のコロニーが減少した (図 12)。

- 25 次いで、**retrorsine** を 60 mg/kg を腹腔内投与した **uPA-Tg(+/-)/SCID** マウスおよび **uPA-Tg(+)/SCID** マウスに実施例 1 と同様にしてヒト肝細胞を移植し、キメラマウスを作成した。その結果、**uPA-Tg(+/-)/SCID** マウスをレシピエントするキメラマウスにおいても、**uPA-Tg(+)/SCID** マウス由来のキメラマウスと同程度に血中ヒトアルブミン濃度が増加した。

実施例 5

30

ヒト肝細胞キメラマウスへの抗マウス **Fas** 抗体投与

実施例 1 で作製したキメラマウスの 1 匹について、ヒト肝細胞移植から 100 日経過した時点で、マウス肝細胞の Fas 抗原に反応してマウス肝細胞のアポトーシスを誘導する抗マウス Fas 抗体 (0.2 μ g/g b.w.) を 1 週間間隔で 2 回腹腔内投与した。

結果は図 13 に示したとおりである。このキメラマウスは、ヒト肝細胞移植から約 80 日以降、血中のヒトアルブミン濃度が減少傾向を示したが、抗マウス Fas 抗体の投与により、血中ヒトアルブミン濃度を著しく上昇させた。

以上の結果、この発明の方法においては、ヒト肝細胞移植後のキメラマウスに抗 Fas 抗体を投与することが、ヒト肝細胞の増殖および／または活性化に有効であることが確認された。

実施例 6

ヒト増殖性肝細胞を認識するモノクローナル抗体の作製

1. ヒト肝細胞の培養

ヒト肝臓組織よりコラゲナーゼ灌流法により、細胞分散液を得た。細胞分散液を低速遠心分離 (50g、2 分) し、その沈殿画分を牛胎児血清、ヒト血清、EGF、ニコチンアミド、活性持続型ビタミン C を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用い、マイトマイシン C 処理した Swiss 3T3 細胞と混合培養した。Swiss 3T3 細胞は 10 日毎に添加した。培養 7 日目頃よりヒト肝細胞のコロニーが観察された。コンフルエントに増殖した肝細胞を EDTA/Trypsin を用いて継代した。継代は、子供の肝細胞では 6-9 回継代でき、60 才以上の患者の肝細胞は 3-4 回しか継代できなかった (図 14)。もっとも高い増殖能を示した子供 (12 才) の肝細胞を抗原として用いた (図 15)。

2. 動物の免疫

上記方法により、3-5 回継代培養した子供 (12 才) の肝細胞を培養皿上で増やした。コンフルエントに増殖した細胞 (約 1×10^7 個) を、PBS (リン酸緩衝

塩類溶液)で洗浄した後、PBSを取り除き、セルスクレーパーで掻き取って回収し、PBS 約 1ml に懸濁した。これを 6 週齢の Balb/c マウスの腹腔内に投与した。さらに 20 日後または 30 日後に、同様の方法で免疫を行った。

5 3. 細胞融合

2 回の免疫後、抗体価の上昇がみられたため、3 回目の免疫 (boost) の 72 時間後、1 匹の免疫動物より脾臓を摘出、脾臓細胞を採取した。この脾臓細胞とマウスミエローマ細胞 (細胞名 NS-1) を細胞融合し、96-well plate に 372 well 播種、培養した。

10

4. ハイブリドーマのスクリーニング

1 次スクリーニング (ELISA、組織染色) :

得られた融合細胞の培養上清の抗原に対する反応性を ELISA により測定した。測定は以下の方法により実施した。抗原として用いた継代培養肝細胞を 96-well plate に播種し、培養後 PBS で洗浄、乾燥させ -80℃ で保存しておいたものに、培養上清を反応させた。次に酵素標識の抗マウス IgG または抗マウス IgM 抗体を反応させ、基質を加えて発色させ、その吸光度を測定した。その結果、融合細胞 372 サンプルの吸光度の平均は 0.149 (SD: 0.099) で、このうち吸光度 0.20 以上 (81 サンプル、約 20%) のサンプルを陽性とした。また目視において、吸光度 0.15 以上でも発色が確認されたことから、0.15~0.20 のサンプル (46 サンプル) については、組織染色を行い反応性を確認した。その中から、興味深い染色パターンを示した 13 サンプルについてのみ陽性サンプルとした。選択した陽性サンプル、94 サンプルをスケールアップしてさらに培養し、培養上清を回収後、細胞を凍結保存した。

25

5. 2 次スクリーニング (ELISA、組織染色) :

1 次スクリーニングで選んだ 94 サンプルから、スケールアップ後の培養上清の抗原に対する反応性を 1 次スクリーニングと同様の ELISA により測定し、陽性サンプル、88 サンプルを選んだ。さらに、これらのサンプルの、組織における反応性を組織染色により調べた。そのなかから、肝細胞の細胞膜や、門脈域の

30

肝細胞に特異的に反応するハイブリドーマを含むサンプル、または、そこからクローニングによって得られたクローンの培養上清について、分離直後のヒト肝細胞への反応性を調べた。

- 組織において門脈域の肝細胞膜が染まるハイブリドーマ培養上清 (No. 23)
- 5 (図 16) について、分離直後の肝細胞表面における反応性を、FACS (Fluorescence activated cell sorting) を用いて解析した。成人男性 (46 才および 49 才) の肝臓からコラゲナーゼ灌流、低速遠心により得られた細胞を、このサンプルの培養上清で 4℃、30 分処理し、次に FITC 標識した抗マウス IgG 抗体を 4℃、30 分処理することにより、FACS での検出を可能にした。その
- 10 の結果、肝細胞集団の一部 (1~2%) の細胞がこのサンプルに反応した (図 17)。そこで、これらの細胞集団を R2、反応しなかった細胞集団を R3 として分取し、培養した。また分取前の肝細胞も同様に培養した。その結果、分取前の肝細胞では、前述したように、培養 7 日目頃より、コロニー形成が観察された。一方、R3 画分においては、コロニーを形成する細胞は観察されなかったが、No.
- 15 23 に反応した R2 画分において、多くのコロニーが観察された (図 18)。また、継代培養ヒト肝細胞への反応性を FACS により調べたところ、約 80% の細胞が陽性であった (図 19)。すなわち、継代培養ヒト肝細胞のうち培養過程で分化した細胞は認識せず、増殖性肝細胞のみを認識していると考えられた。このことから、No. 23 には、コロニーを形成する細胞を特異的に認識するハイブリドーマが含まれている可能性が示唆された。No.23 サンプルからクローニングにより得られたクローンについても分離直後の肝細胞表面における反応性を FACS
- 20 を用いて解析した。その結果、同様の反応性を示すクローンが 3 クローン得られた。これらの中から、1 クローン (Mouse-Mouse hybridoma K8223) を 2002 年 3 月 6 日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに
- 25 特許微生物として寄託し (受託番号 FERM P-18752)、さらに 2003 年 3 月 20 日付で国際寄託した (受託番号 FERM BP-8334)。

6. モノクローナル抗体の作製

- 前記のハイブリドーマ (K8223 株) 細胞を培養することによって、さらに、
- 30 マウス腹腔内にハイブリドーマ細胞を注射し、腹水からモノクローナル抗体を採

取することにより、増殖性ヒト肝細胞と特異的に結合するモノクローナル抗体を得た。

5

実施例 7

ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製

非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞のみを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、実施例 6 の 1 次スクリーニングで選択した 94 サンプルのうち ELISA において陽性であった 88 サンプルからヒト肝臓組織における組織染色により選択した。肝細胞の細胞膜が部域に関係なく一様に染まるハイブリドーマ培養上清 3 サンプルについて、培養ヒト肝細胞や分離直後のヒト肝細胞および非ヒト動物（マウス、ラット）肝細胞の細胞表面への反応性を FACS を用いて解析した。成人男性（46 才または 68 才）の肝臓からコラゲナーゼ灌流、
15 低速遠心により得られた細胞を、選択した 3 サンプルの培養上清で 4℃、30 分処理し、次に FITC 標識した抗マウス IgG 抗体を 4℃、30 分処理することにより、FACS での検出を可能にした。FACS によるスクリーニングの結果、ヒトの肝細胞のみに反応し、マウスおよびラット肝細胞には反応しないハイブリドーマ（クローニング前）を 1 サンプル選択した。これより得られたモノクローンの
20 ハイブリドーマ培養上清、2 クローンも同様の反応性を示した（図 20）。選択したハイブリドーマ培養上清での組織染色ではヒト肝組織の毛細胆管と思われる部位が染まり、その染色性において部域差は認められなかった。またマウスおよびラット肝組織はこのハイブリドーマ培養上清に対していずれも陰性であった。以上の結果より、非ヒト動物の肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識する
25 抗ヒト肝細胞モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られた。このハイブリドーマ K8216 株を 2002 年 3 月 6 日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに特許生物として寄託し（受託番号 FERM P-18751）、さらに 2003 年 3 月 20 日付で国際寄託した（受託番号 FERM BP-8333）。

30 この K8216 株から実施例 6 と同様の方法で、モノクローナル抗体を得た。

産業上の利用可能性

- 5 以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、ヒト肝細胞を、その機能を保持した状態で大量に増殖させることが可能となる。また、肝臓内の細胞の多くがヒト肝細胞に置換したキメラマウスが提供される。このキメラマウスやヒト肝細胞を用いた化合物の薬物代謝試験や安全性試験が可能となる。

請求の範囲

1. 免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態でヒト肝細胞移植マウスを飼育することにより、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で増殖させることを特徴とするヒト肝細胞増殖方法。
2. ヒト補体の攻撃から防御させた状態が、以下の(a)および(b):
 - (a) ヒト肝細胞移植マウスに少なくとも 1 回、補体抑制剤を投与すること;
 - 10 (b) 免疫不全肝障害マウスとして、免疫不全肝障害マウスと decay-accelerating factor (DAF/CD55)トランスジェニックマウスを交配して得られた子孫マウスを使用すること、
の少なくとも一方である請求項 1 のヒト肝細胞増殖方法。
- 15 3. 免疫不全肝障害マウスが、遺伝的免疫不全マウスと遺伝的肝障害マウスとを交配して得られた子孫マウスである請求項 1 または 2 のヒト肝細胞増殖方法。
4. 子孫マウスが、ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスである請求項 3 のヒト肝細胞増殖方法。
- 20 5. ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスに、肝細胞増殖阻害物質を投与した後、ヒト肝細胞を移植する請求項 4 のヒト肝細胞増殖方法。
6. ヒト肝細胞を移植した免疫不全肝障害マウスに抗マウス Fas 抗体を投与する請求項 1 から 5 のいずれかのヒト肝細胞増殖方法。
- 25 7. 免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植するヒト肝細胞が、増殖性ヒト肝細胞である請求項 1 のヒト肝細胞増殖方法。
- 30 8. 増殖性ヒト肝細胞が、コロニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異

的に認識するモノクローナル抗体によって認識されたヒト肝細胞である請求項 7 のヒト肝細胞増殖方法。

9. モノクローナル抗体が、Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM BP-
5 8334) が産生するモノクローナル抗体である請求項 8 のヒト肝細胞増殖方法。

10. 以下のステップ(1)~(3)：

- (1) 免疫不全肝障害マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態でヒト肝細胞移植マウスを飼育することによって、移植したヒト肝細胞をマウス肝臓で増殖させるステップ；
10 (2) マウス肝臓から増殖したヒト肝細胞を単離するステップ；および
(3) 単離したヒト肝細胞を、免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植し、ヒト肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態でヒト肝細胞移植マウスを 50
15 日以上飼育するステップ、
からなり、ステップ(2)および(3)を 1 回以上繰り返すことを特徴とするヒト肝細胞大量増殖方法。

11. ステップ(1)および/または(3)におけるヒト補体の攻撃から防御させた状態が、以下の(a)および(b)：

- (a) ヒト肝細胞移植マウスに少なくとも 1 回、補体抑制剤を投与すること；
20 (b) 免疫不全肝障害マウスとして、免疫不全肝障害マウスと decay-accelerating factor (DAF/CD55)トランスジェニックマウスを交配して得られた子孫マウスを使用すること、
の少なくとも一方である請求項 10 のヒト肝細胞大量増殖方法。

25

12. ステップ(1)および/または(3)において、免疫不全肝障害マウスが、遺伝的免疫不全マウスと遺伝的肝障害マウスとを交配して得られた子孫マウスである請求項 10 または 11 のヒト肝細胞大量増殖方法。

30 13. 子孫マウスが、ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスである請求項 12 のヒト

肝細胞大量増殖方法。

14. ヘミ接合体免疫不全肝障害マウスに肝細胞増殖阻害物質を投与した後、ヒト肝細胞を移植する請求項 13 のヒト肝細胞大量増殖方法。

5

15. ステップ(1)および/または(3)において、ヒト肝細胞を移植した免疫不全肝障害マウスに抗マウス Fas 抗体を投与する請求項 10 から 14 のいずれかのヒト肝細胞大量増殖方法。

10 16. ステップ(1)および/または(3)において免疫不全肝障害マウスの肝臓に移植するヒト肝細胞が、増殖性ヒト肝細胞である請求項 10 のヒト肝細胞大量増殖方法。

15 17. 増殖性ヒト肝細胞が、コロニーを形成しながら増殖するヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識されたヒト肝細胞である請求項 16 のヒト肝細胞大量増殖方法。

20 18. モノクローナル抗体が、Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM BP-8334) が産生するモノクローナル抗体である請求項 17 のヒト肝細胞大量増殖方法。

19. ステップ(2)において、以下の(a)および(b)：
(a) マウス肝臓から分離した肝臓組織をコラゲナーゼ処理する；および
(b) 非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル
25 抗体によって認識された細胞を単離する、
の少なくとも一方を行うことによって、実質的にヒト肝細胞のみを単離する請求項 10 のヒト肝細胞大量増殖方法。

30 20. モノクローナル抗体が、Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM BP-8333) が産生するモノクローナル抗体である請求項 19 のヒト肝細胞大量増殖

方法。

21. 請求項 1 から 9 のいずれかのヒト肝細胞増殖方法、または請求項 10 から 20 のいずれかのヒト肝細胞大量増殖方法によって増殖させたヒト肝細胞を肝臓内に有するキメラマウス。

22. 増殖したヒト肝細胞が、肝臓内の細胞の 70% 以上を占めている請求項 21 のキメラマウス。

23. ヒト型 P450 活性を有する請求項 21 または 22 のキメラマウス。

24. 請求項 21、22 または 23 のキメラマウスの肝臓からヒト肝細胞を単離することを特徴とするヒト肝細胞取得方法。

25. 以下の(a)および(b)：

(a) マウス肝臓から分離した肝臓組織をコラゲナーゼ処理する；および

(b) 非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体によって認識された細胞を単離する、

の少なくとも一方を行うことによって、実質的にヒト肝細胞のみを単離する請求項 24 のヒト肝細胞取得方法。

26. モノクローナル抗体が、Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM BP-8333) が産生するモノクローナル抗体である請求項 25 の取得方法。

27. 請求項 24 から 26 のいずれかの方法によって取得されたヒト肝細胞。

28. 請求項 27 のヒト肝細胞を含む細胞キット。

29. 請求項 27 のヒト肝細胞を充填したハイブリッド型人工肝臓。

30. 非ヒト肝細胞は認識せず、ヒト肝細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体。

31. Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM BP-8333) が産生する請求項
5 30 のモノクローナル抗体。

32. Mouse-Mouse hybridoma K8216 (FERM BP-8333) 。

33. 請求項 21、22 または 23 のキメラマウスに候補物質を全身投与し、候補
10 物質の薬物動態または毒性を試験する方法。

図 1

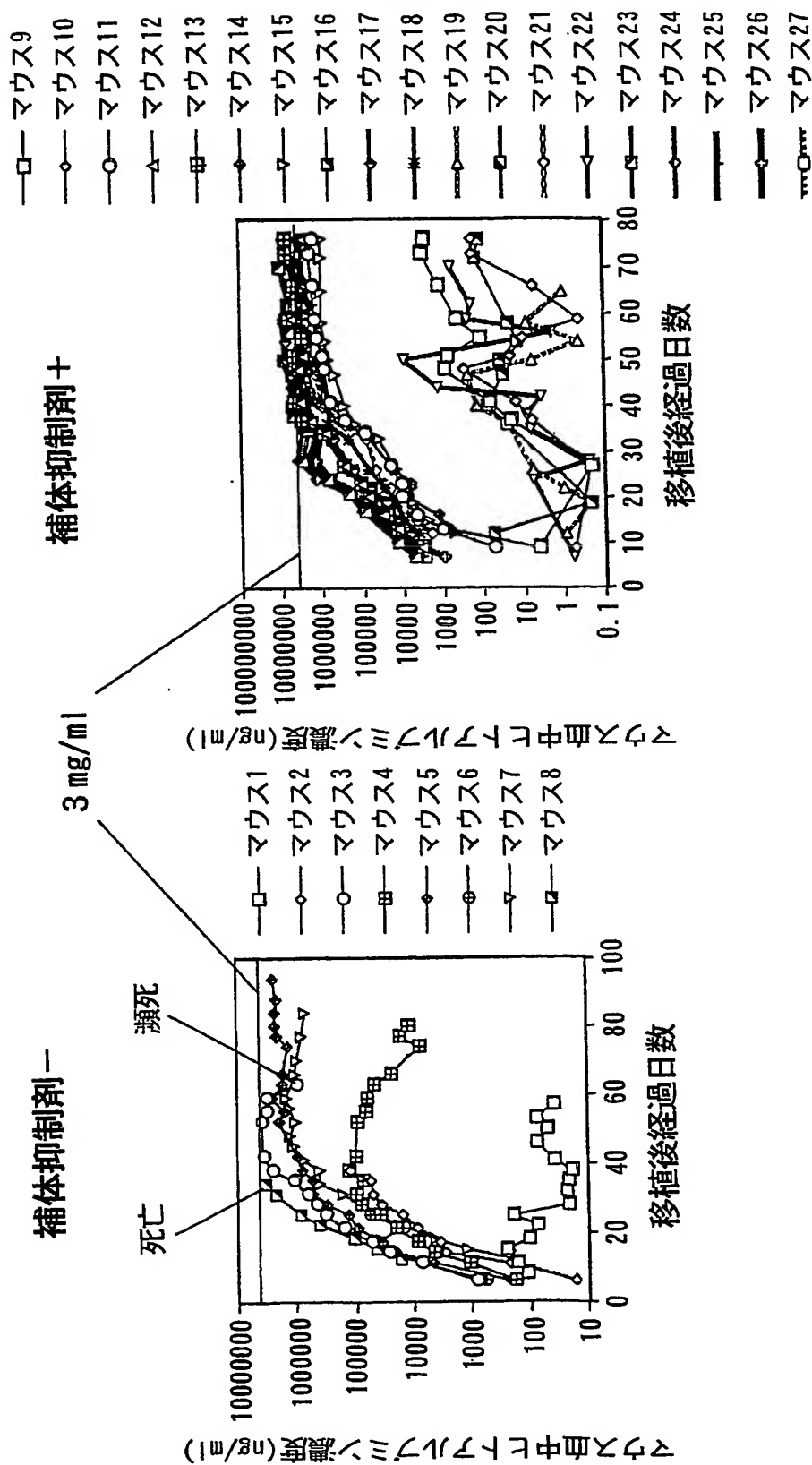


図 2

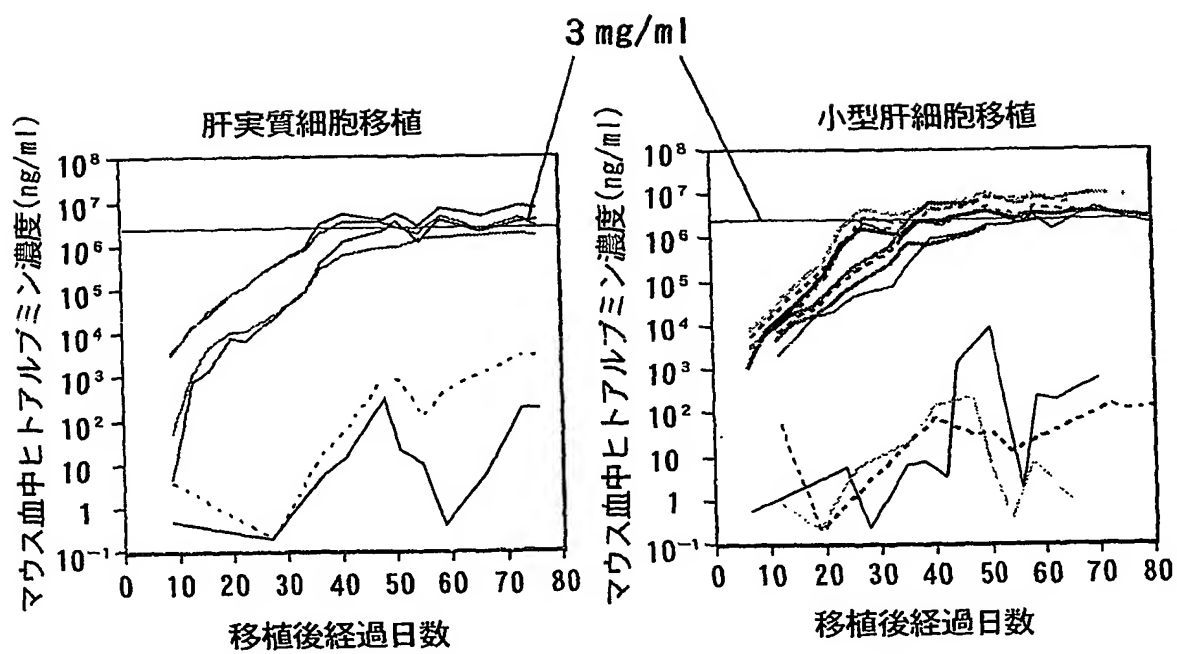


図 3

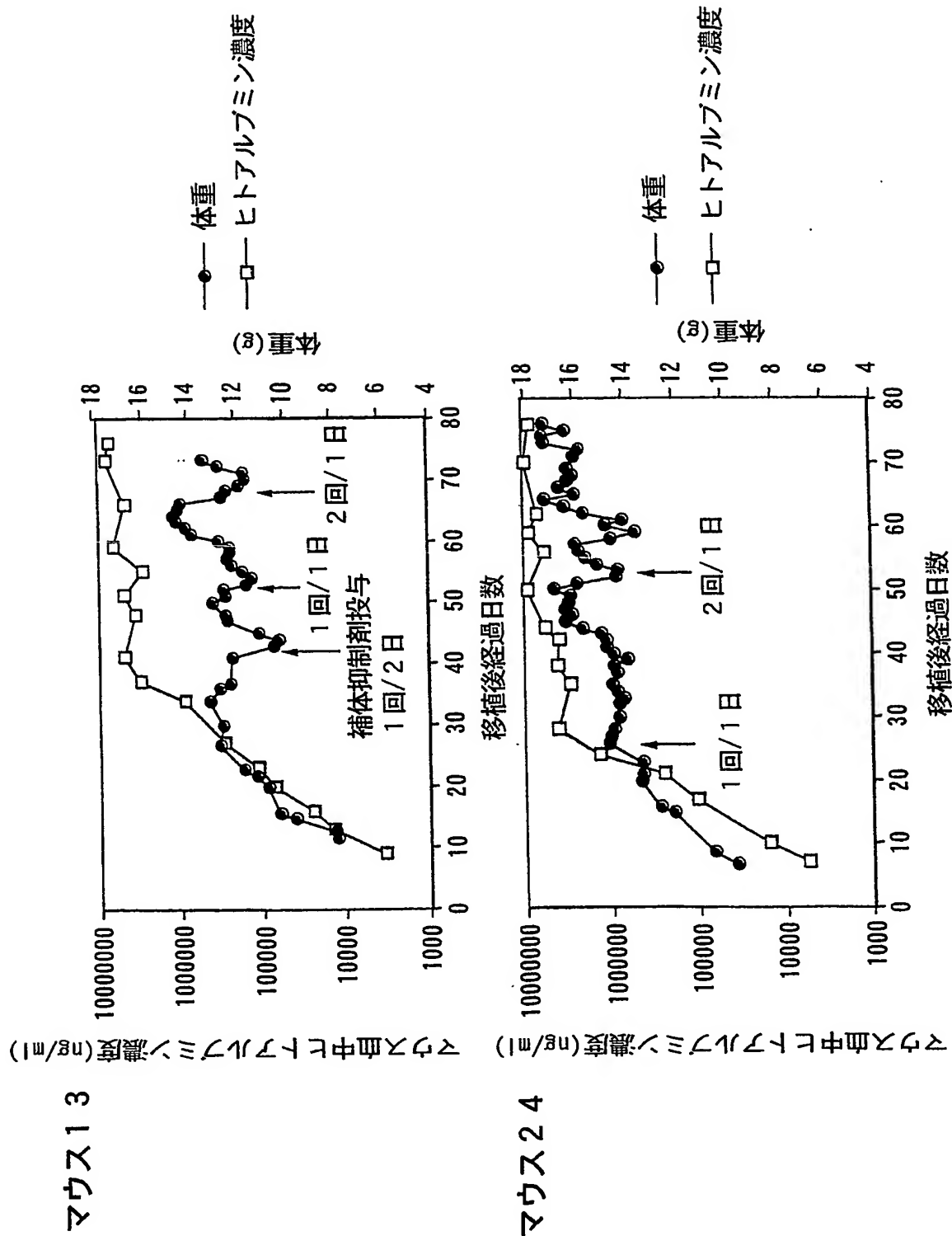


図 4

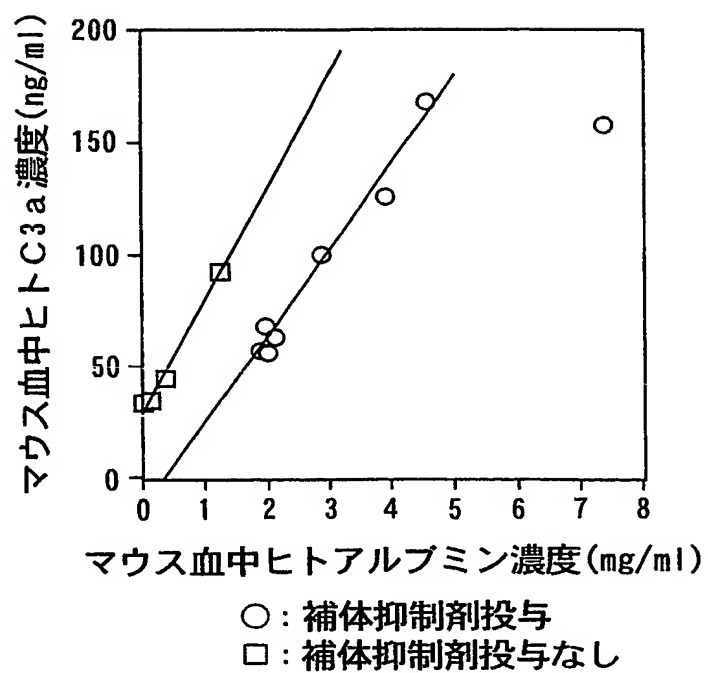


図 5

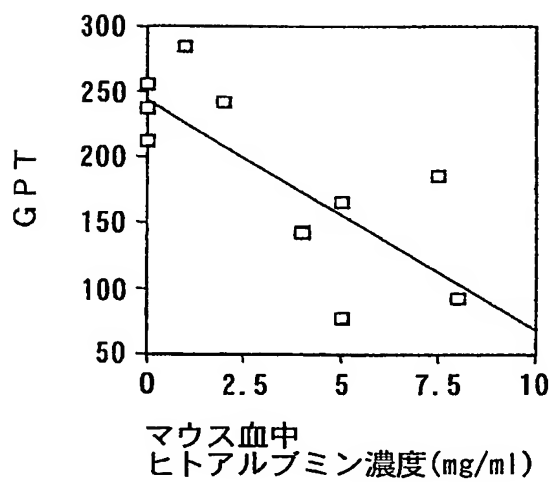
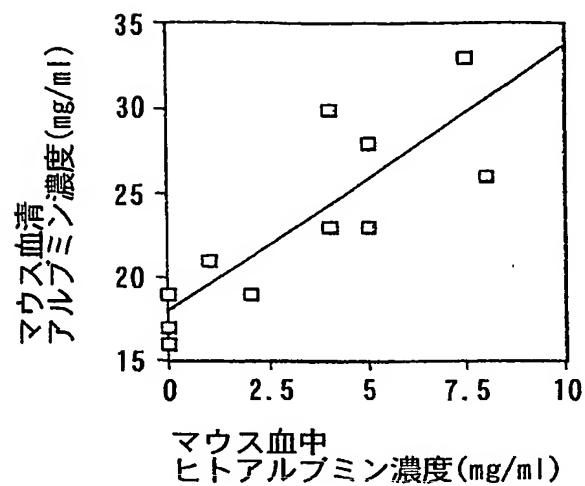
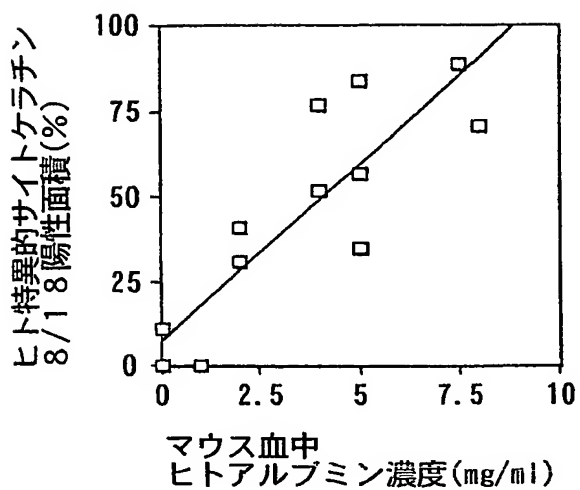


図 6

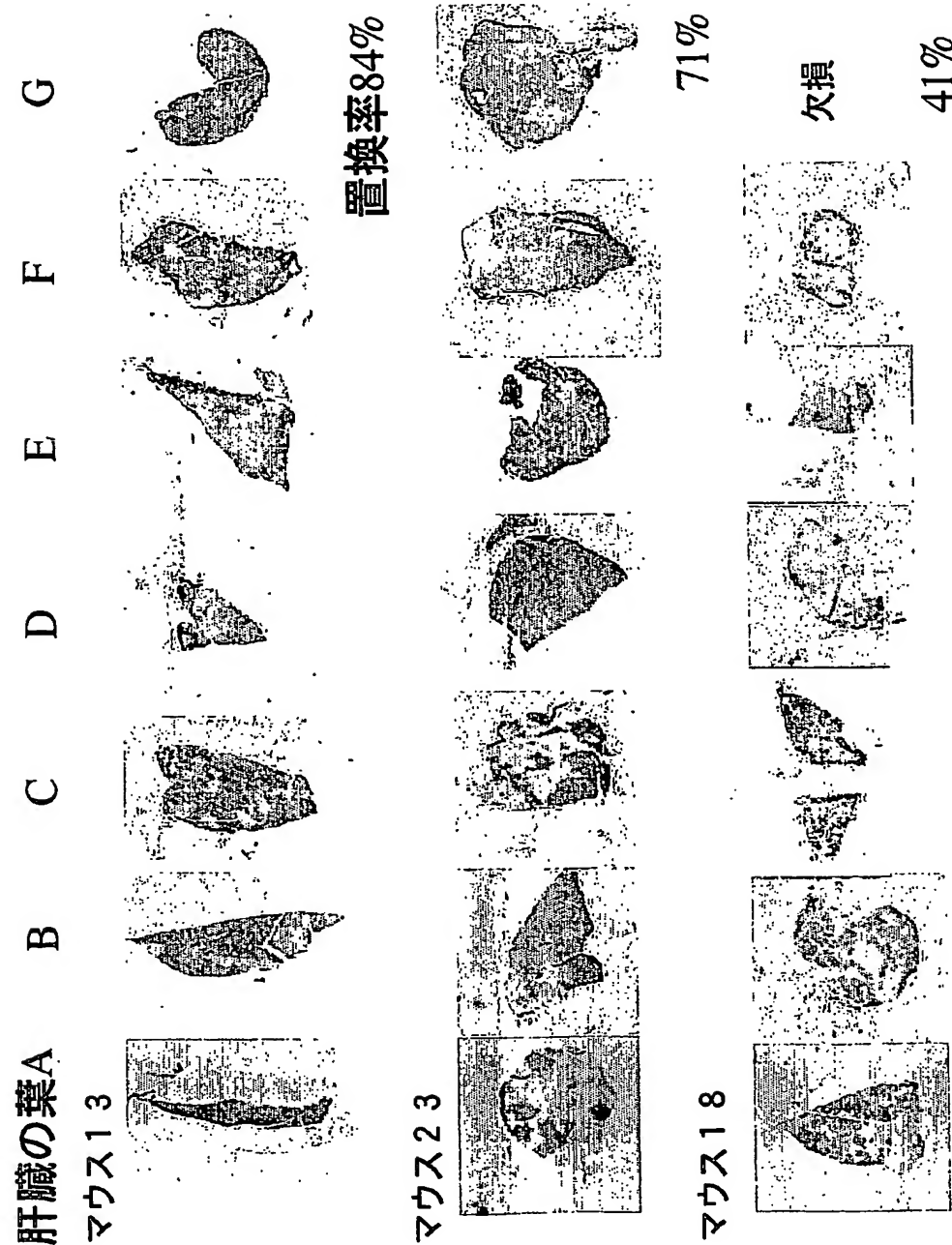


図 7

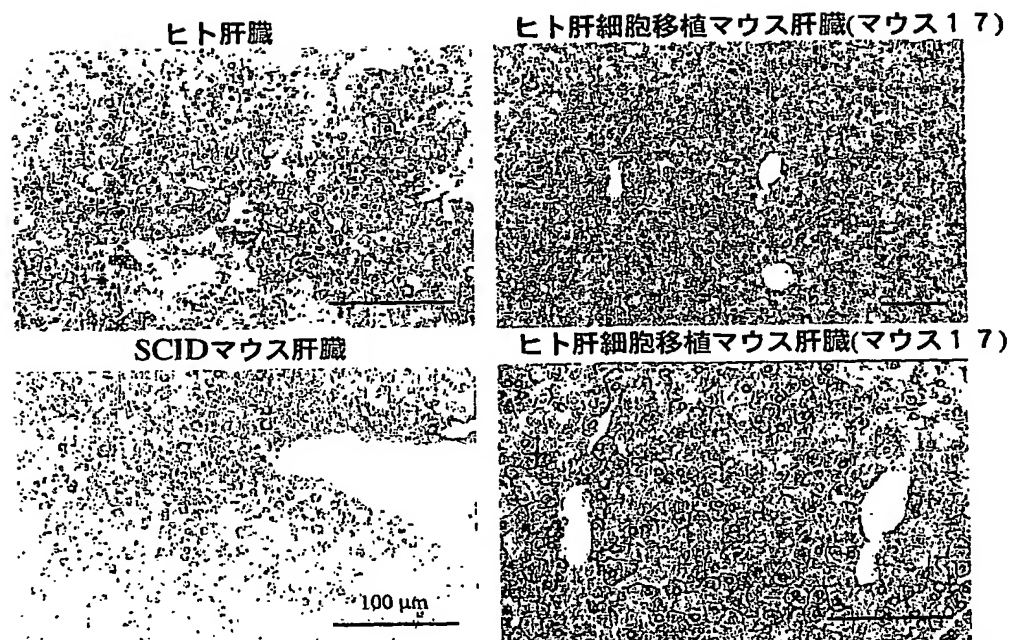


図 8

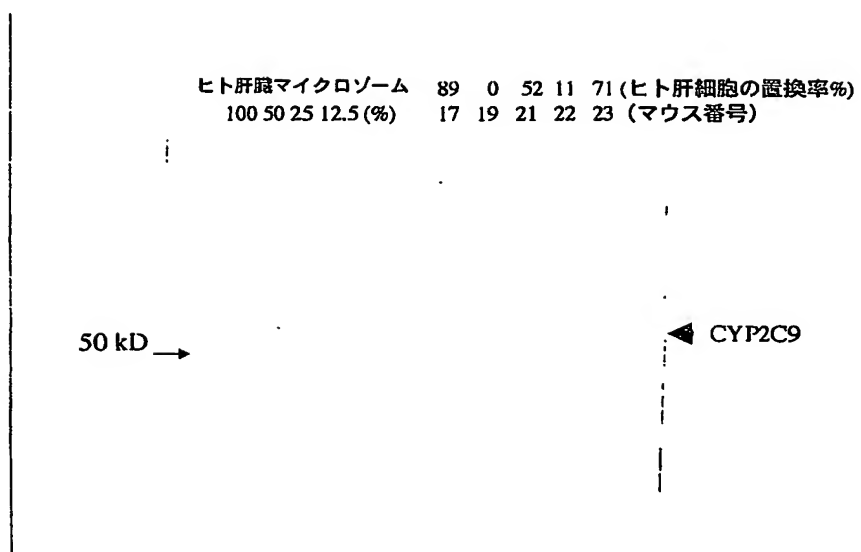


図 9

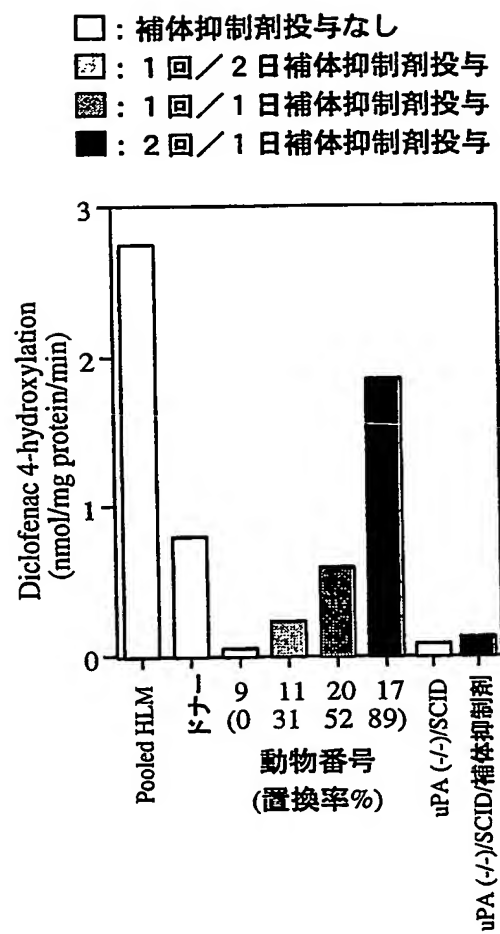


図 10

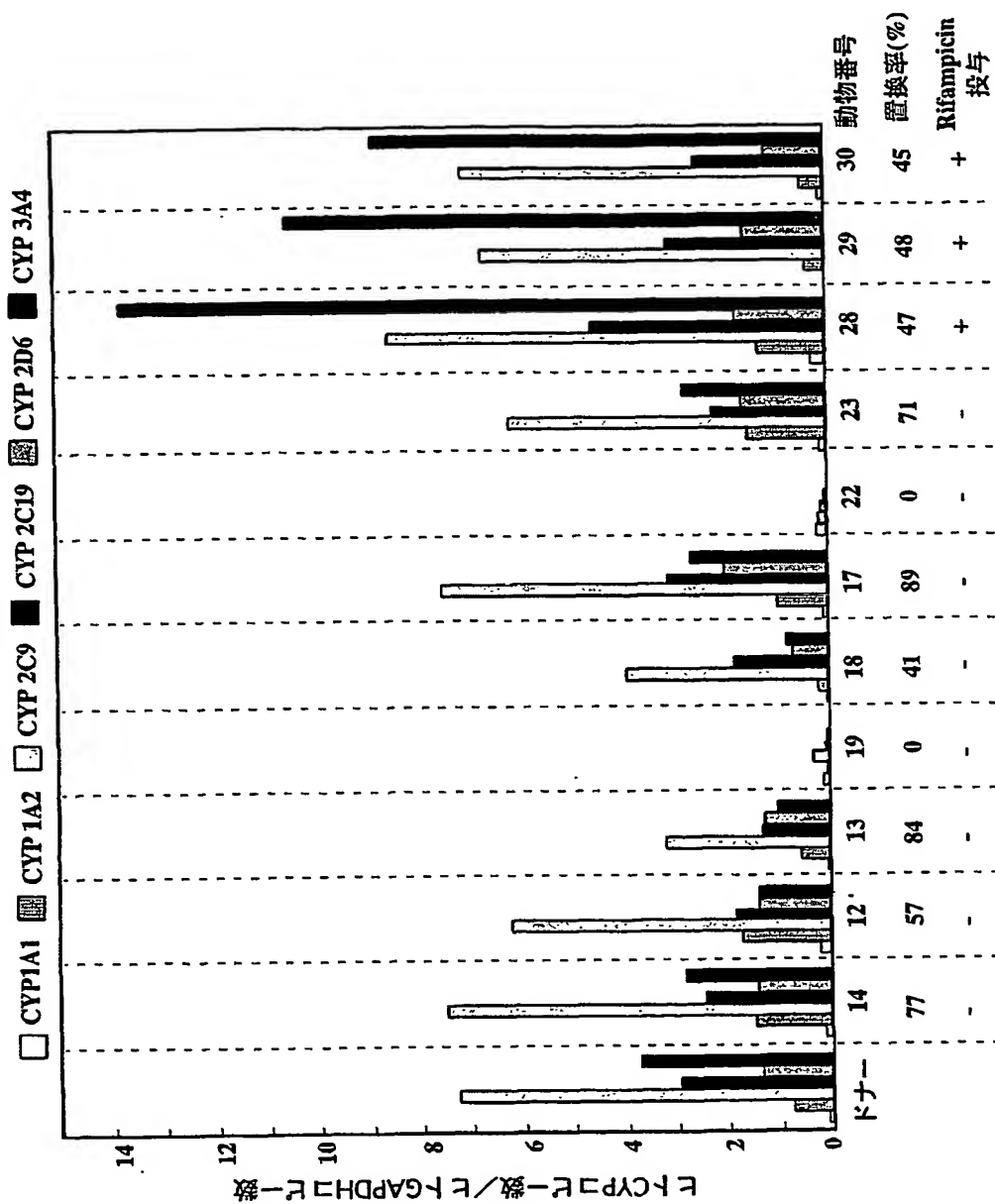


図 1 1

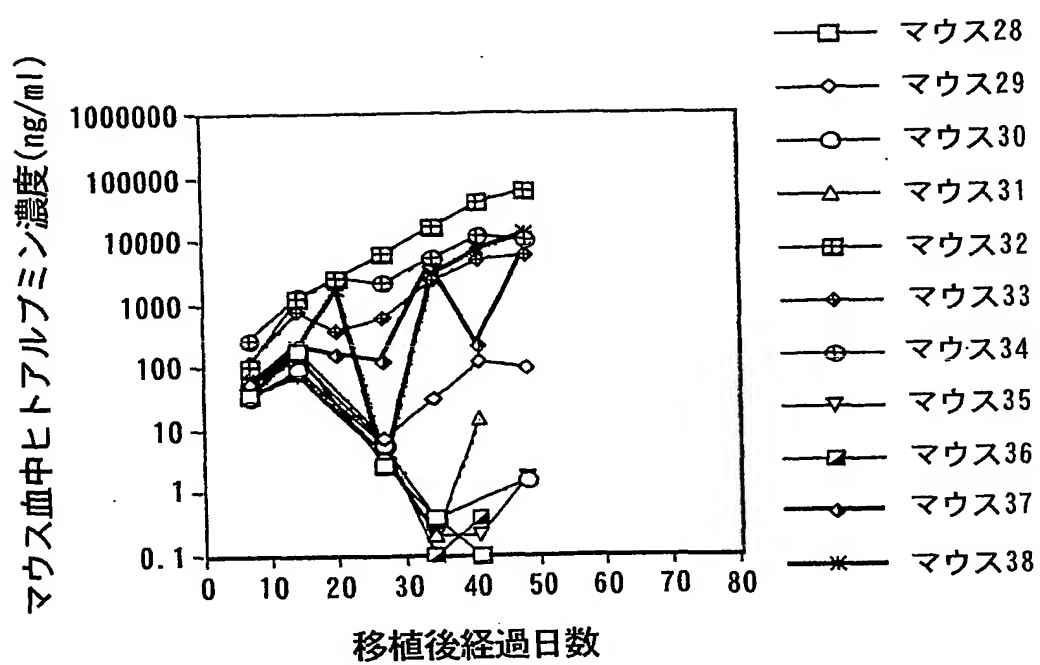


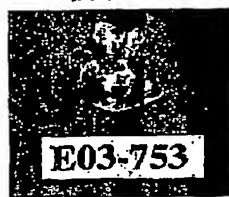
図 1 2

uPA (+/-)SCID 投与 0 週
マウス

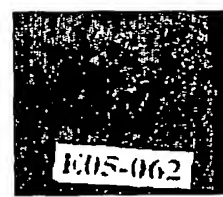
Retrovirus
投与なし



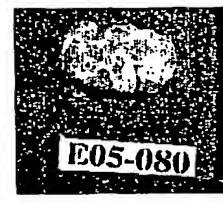
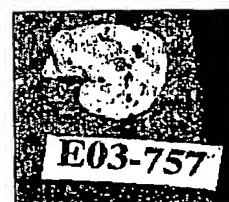
投与 2 週



投与 4 週



Retrovirus
30 mg/kg b.w.



Retrovirus
60 mg/kg b.w.

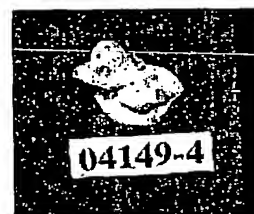


図 1 3

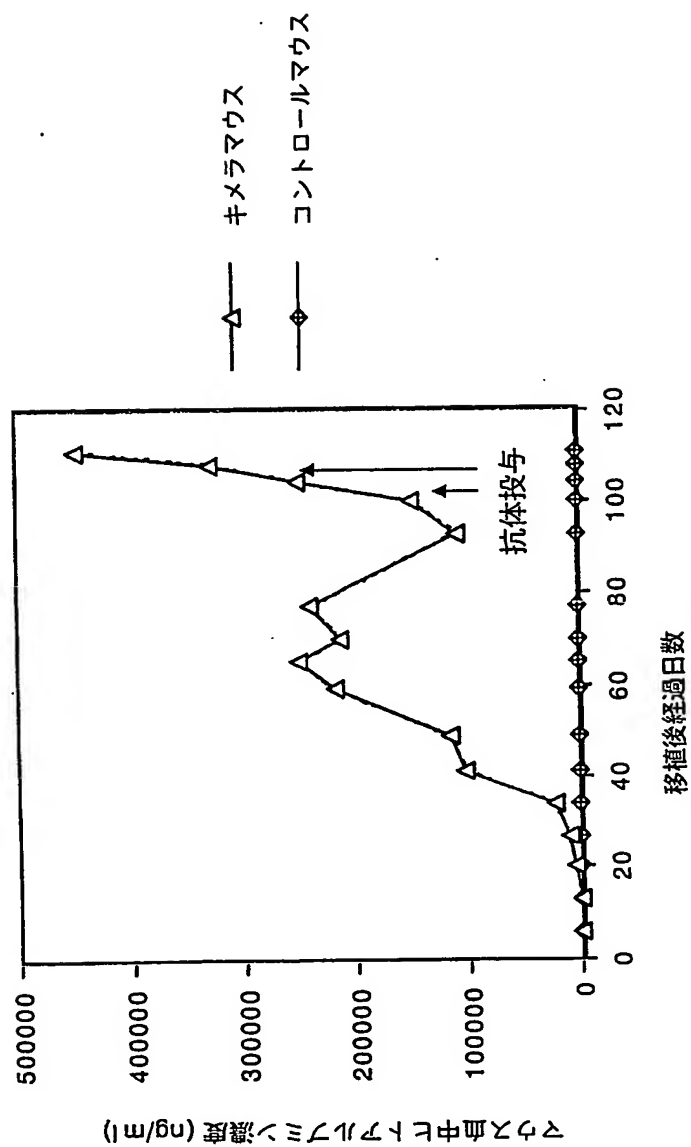


図 1 4

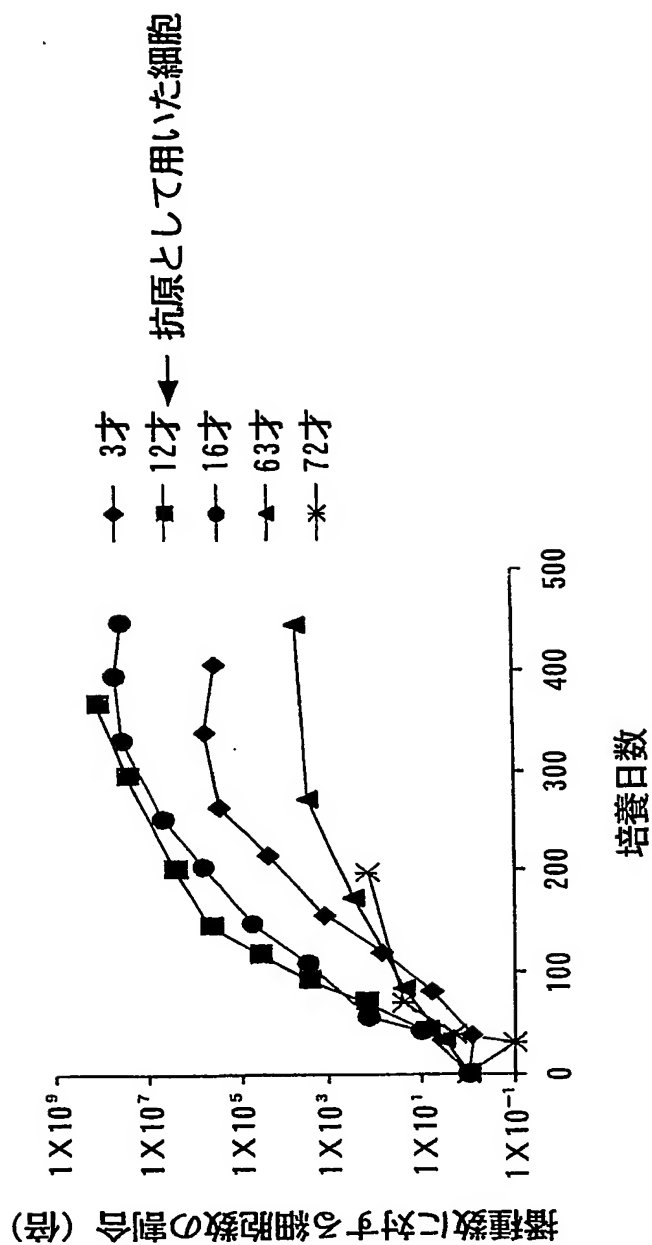
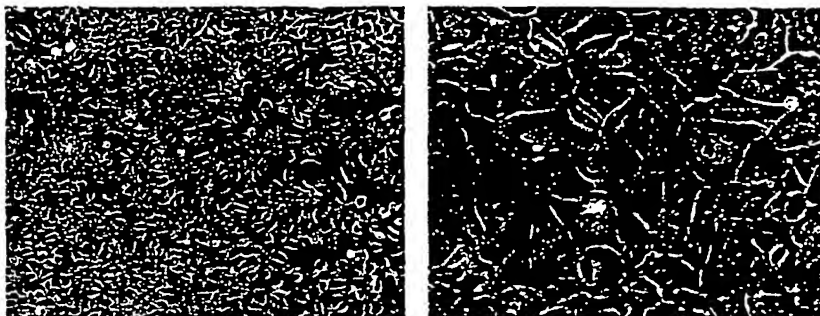


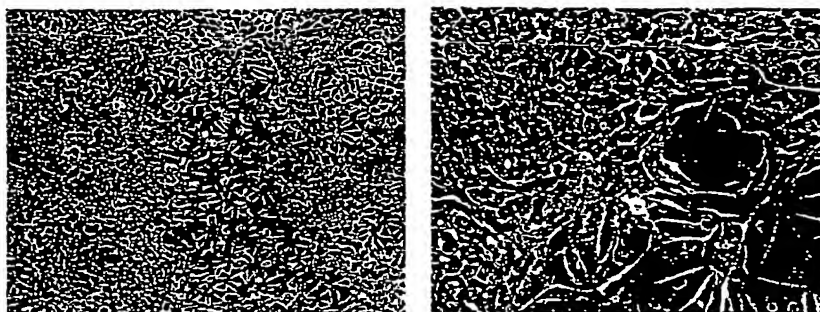
図 1 5

モノクローナル抗体を作るために抗原としたヒト肝細胞（12才）
初代培養

30日目

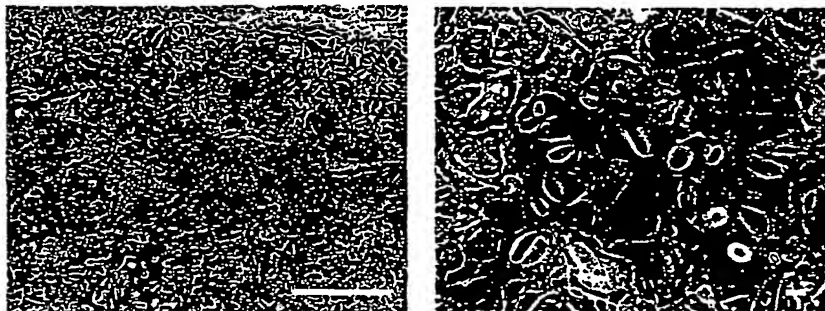


43日目



継代培養（3回）→マウス免疫

33日目

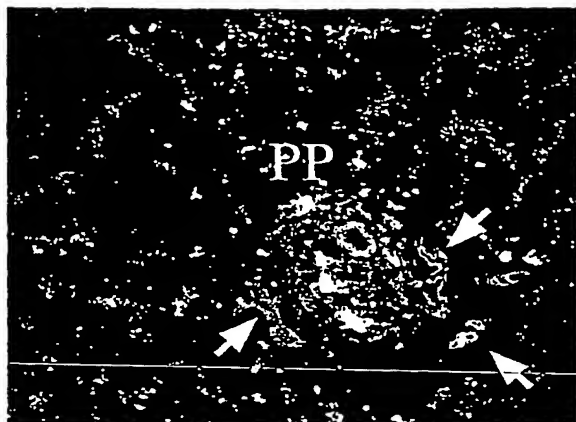


Bar, 100 μ m

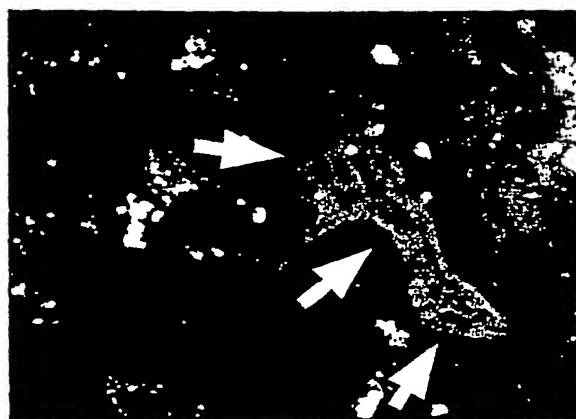
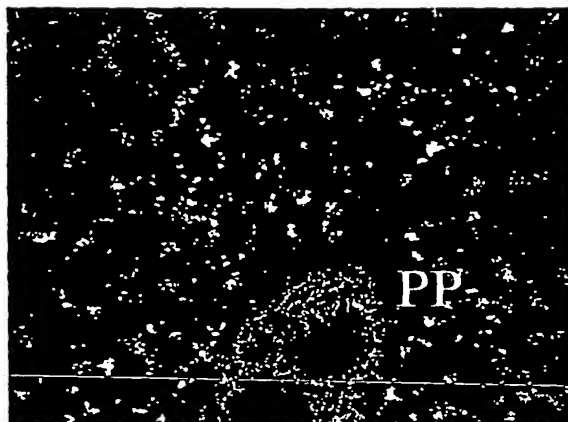
図 1 6

ヒト組織 (62才)
ハイブリドーマ培養上清 (K8223)

K8223

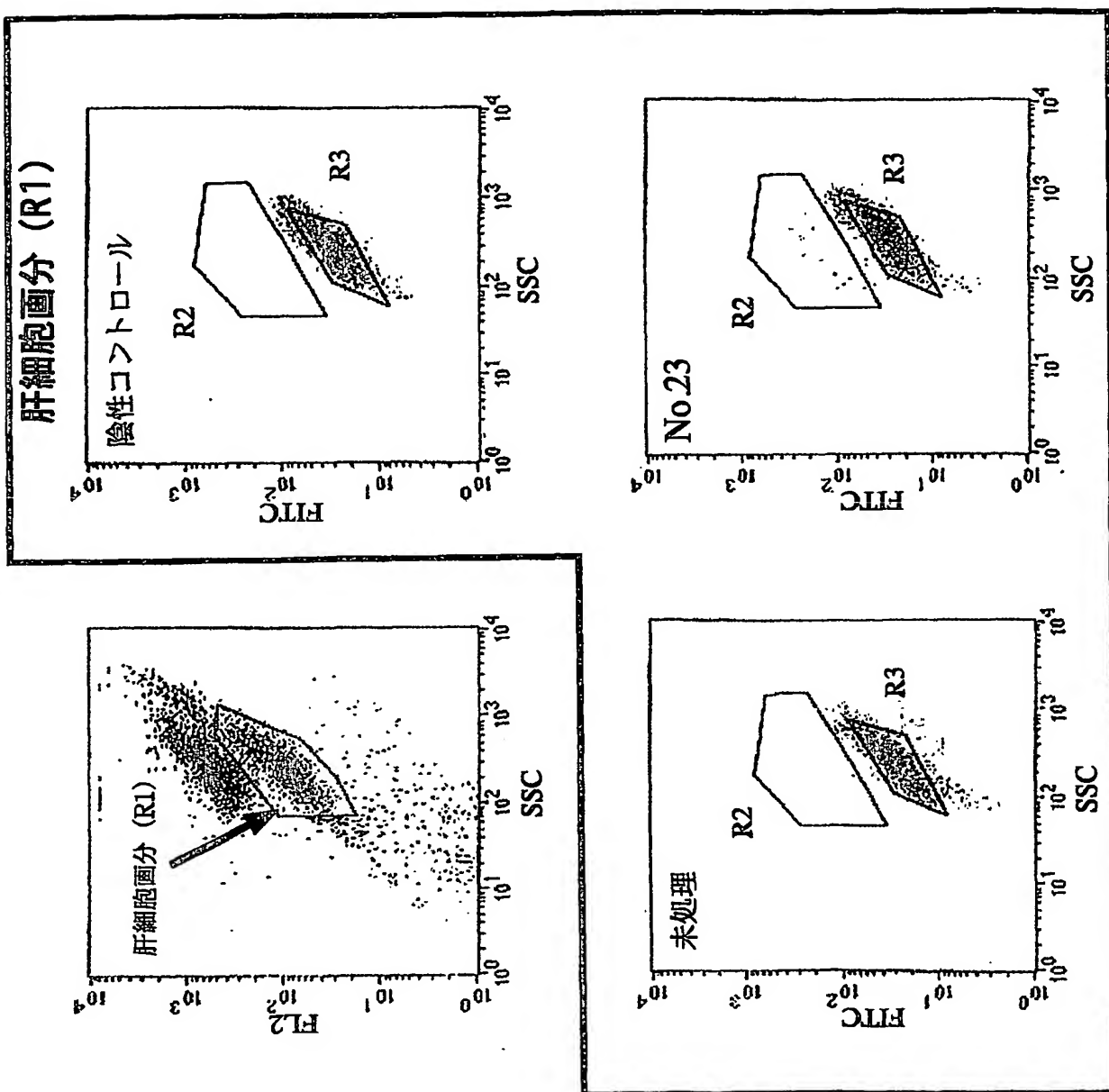


1次抗体なし

Bar, 50 μ m

PP : 門脈域

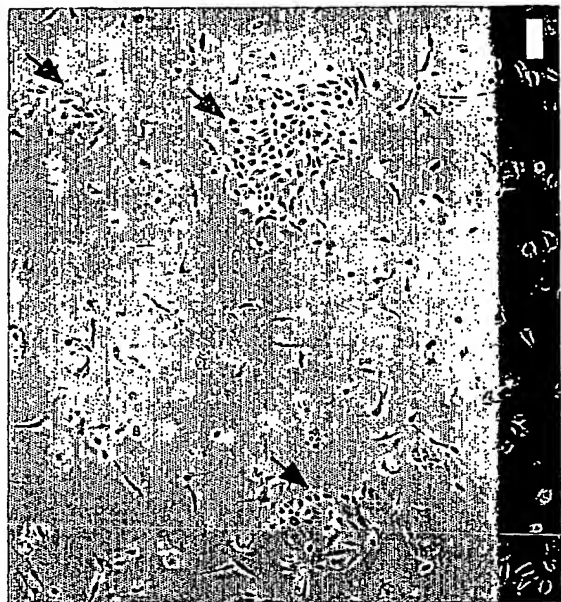
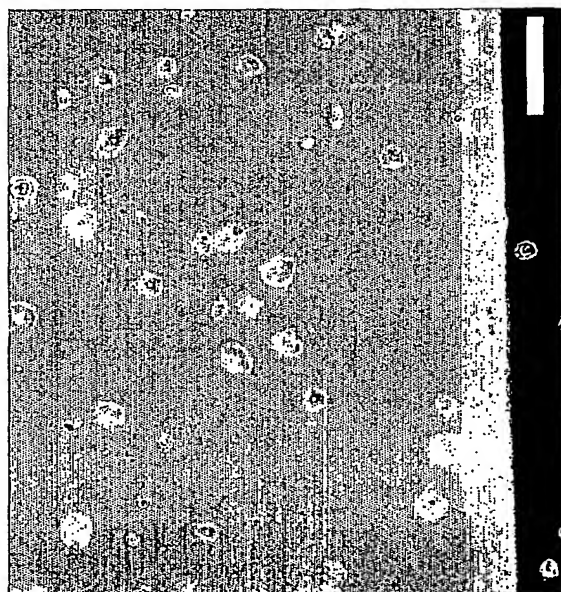
図 1 7



ハイブリドーマ培養上清：No.23
単離ヒト肝細胞（49才）

培養1日目

培養8日目



ソート前

Bar, 100 μ m

図 18

ハイブリドーマ培養上清：No.23
単離ヒト肝細胞（49才）

培養8日目

培養1日目

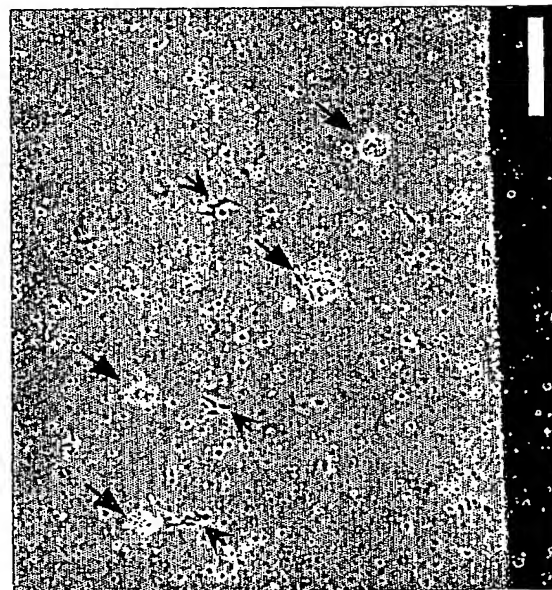
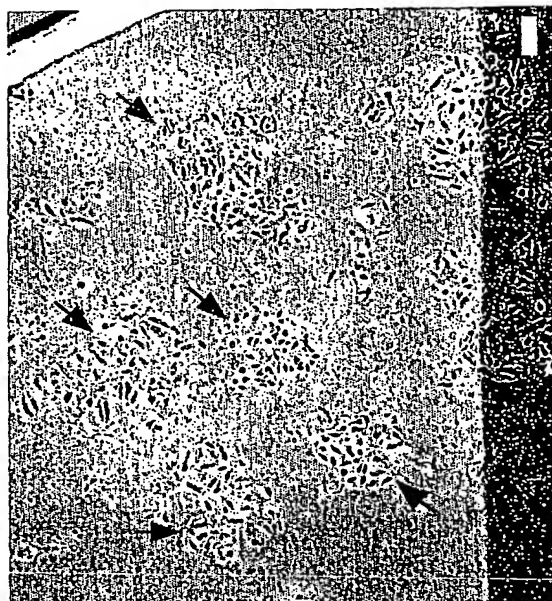


図 1 8

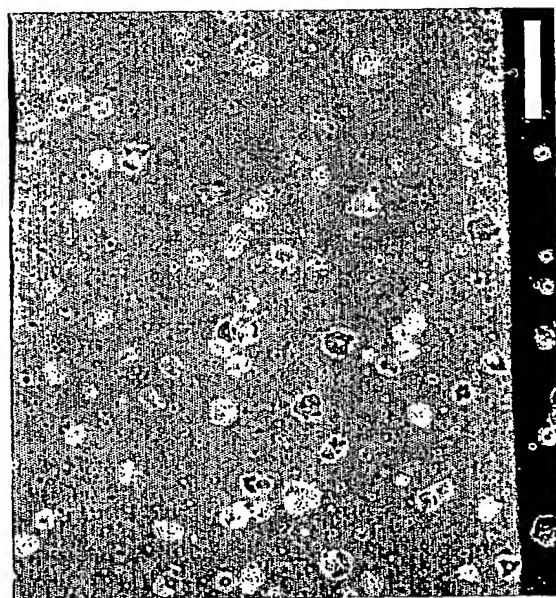
R2 画分

Bar, 100 μ m

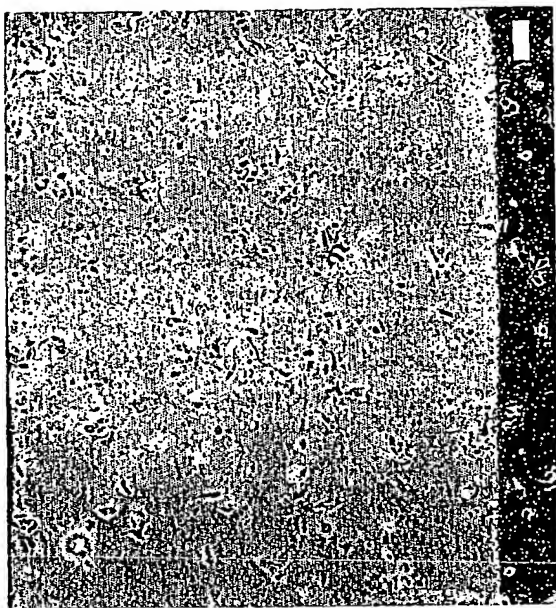
ハイブリドーマ培養上清：No.23
単離ヒト肝細胞（49才）

培養1日目

培養8日目



R3 画分



Bar, 100 μ m

図 1 8

培養ヒト肝細胞 (12才、男児、継代回数 5)

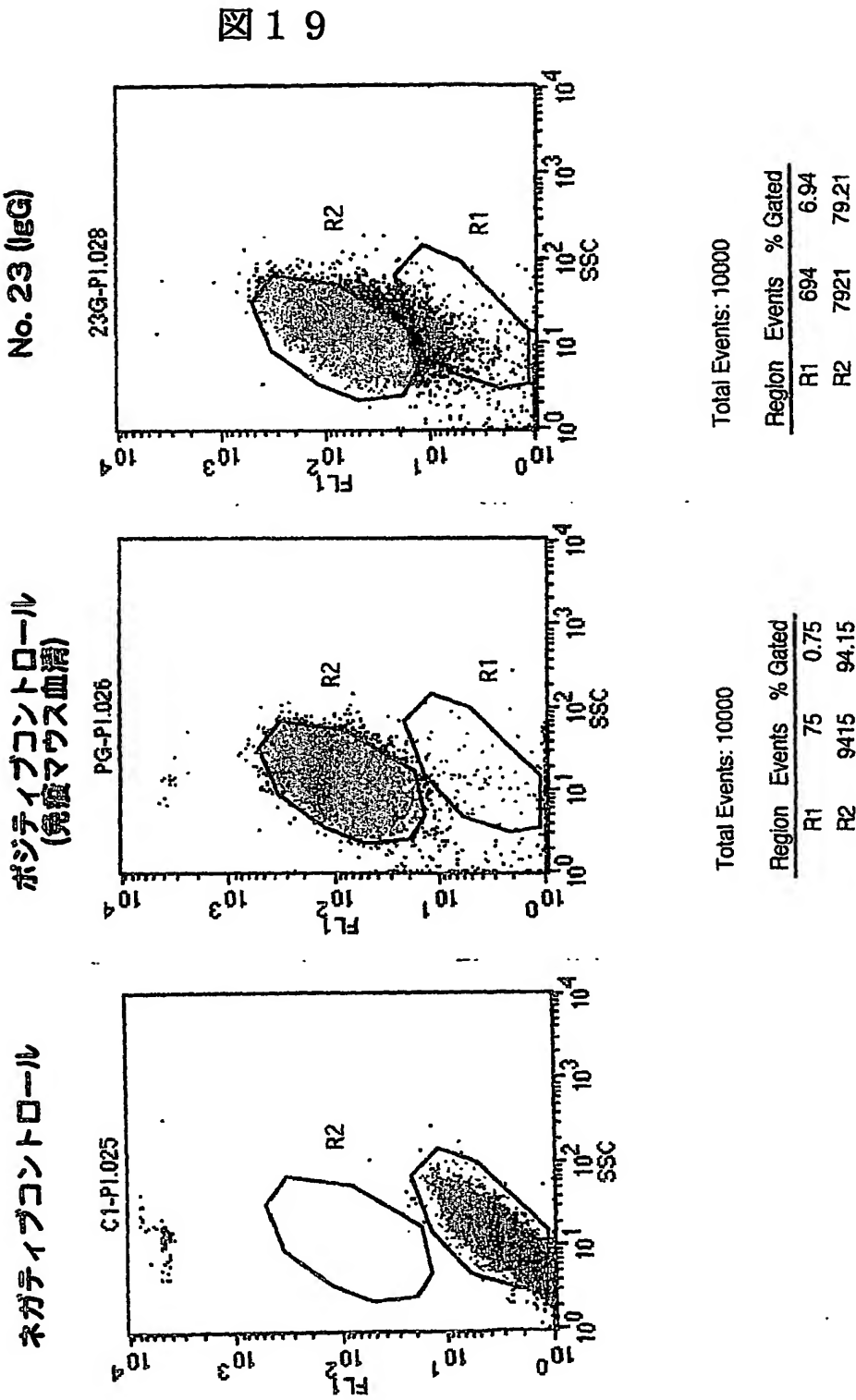
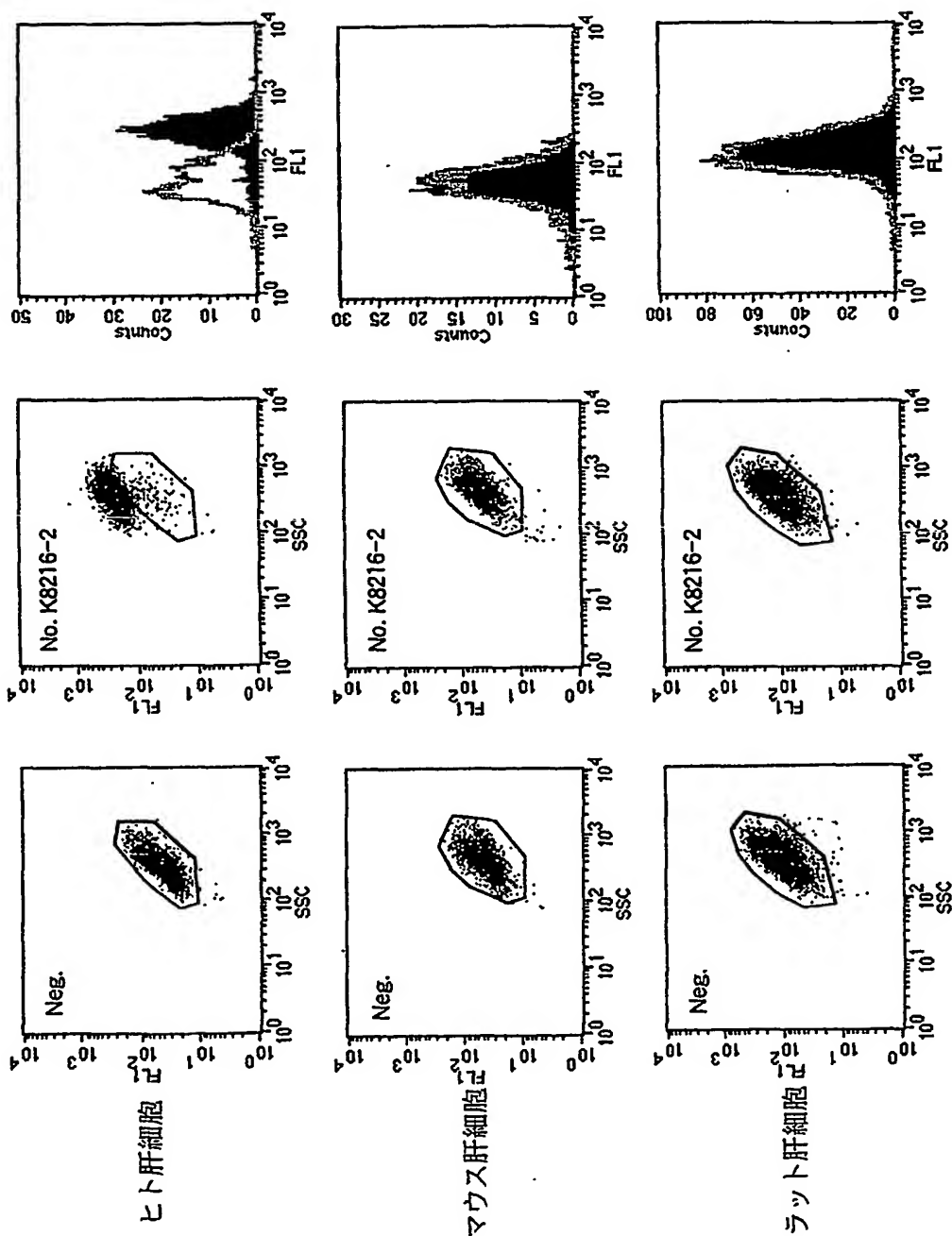


図 20



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation and
Hiroshima Industrial Technology Organization

<120> A method for proliferating human hepatocytes and a method for
obtaining human hepatocytes

<130> 03-F-014

<150> JP 2002-84280

<151> 2002-03-25

<160> 6

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 1

gtcttggtc gctgcaatc

19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 2

cgggagactg aggcaggag

19

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

2/2

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 3

ccgcctcctg ggttcaagcg a

21

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 4

ggatgcaggg atgatgttc

19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 5

tgcaccacca actgcttag

19

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 6

cagaagactg tggatggccc tc

22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03623

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N5/08, C12N15/09, A01K67/027, C12P21/08, C07K16/18,
C12N5/18, A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N5/08, C12N15/09, A01K67/027, C12P21/08, C07K16/18,
C12N5/18, A61L27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 01/87059 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 22 November, 2001 (22.11.01), & JP 2002-45087 A	1-5, 7-14, 16-18, 21-24, 27-29, 33 6, 15, 19, 20, 25, 26
X Y	WO 00/03001 A1 (Rhode Island Hospital), 20 January, 2000 (20.01.00), & EP 1097193 A1 & US 6129911 A & JP 2002-520015 A	27-32 19, 20, 25, 26
X Y	WO 00/43498 A1 (Univ. of North Carolina), 27 July, 2000 (27.07.00), & EP 1147179 A2 & US 2002/0182188 A1 & JP 2002-534974 A	27-32 19, 20, 25, 26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
02 June, 2003 (02.06.03)

Date of mailing of the international search report
17 June, 2003 (17.06.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03623

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 61-189299 A (Nisshin Flour Milling Co.), 22 August, 1986 (22.08.86), (Family: none)	30-32
X	EP 682106 A2 (Research Development Corp. of Japan), 07 May, 1996 (07.05.96), & US 6004810 A & JP 8-112092 A	27-29
Y	ICHIKAWA K. et al., A novel murine anti-human Fas mAb which mitigates lymphadenopathy without hepatotoxicity. Int.Immunol., Vol.12, No.4, pages 555 to 562 (2000)	6,15
Y	EP 990663 A2 (Sankyo Co., Ltd.), 05 April, 2000 (05.04.00), & JP 2000-166574 A	6,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03623

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions relating to a monoclonal antibody as set forth in claims 30 to 32 and the inventions relating to a method of proliferating human hepatocytes as set forth in other claims are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Thus, it is recognized that the claims of the present case have two groups of inventions.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N5/08、C12N15/09、A01K67/027、C12P21/08、C07K16/18、C12N5/18、A61L27/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N5/08、C12N15/09、A01K67/027、C12P21/08、C07K16/18、C12N5/18、A61L27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)、JSTPlus(JOIS)、MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/87059 A1 (科学技術振興事業団) 2001.11.22 & JP 2002-45087 A	1-5, 7-14, 16-18, 21-24, 27-29, 33
<u>Y</u>		6, 15, 19, 20, 25, 26
<u>X</u> <u>Y</u>	WO 00/03001 A1 (Rhode Island Hospital) 2000.01.20 & EP1097193 A1 & US 6129911 A & JP 2002-520015 A	27-32 19, 20, 25, 26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.06.03

国際調査報告の発送日

17.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照



4B

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	WO 00/43498 A1 (Univ. of North Carolina) 2000. 07. 27 & EP1147179 A2 & US 2002/0182188 A1 & JP 2002-534974 A	<u>27-32</u> 19, 20, 25, 26
X	JP 61-189299 A (Nisshin Flour Milling Co.) 1986. 08. 22 (ファミリーなし)	30-32
X	EP 682106 A2 (新技術事業団) 1996. 05. 07 & US 6004810 A & JP 8-112092 A	27-29
Y	Ichikawa K. et al., A novel murine anti-human Fas mAb which mitigates lymphadenopathy without hepatotoxicity. Int. Immunol., Vol. 12, No. 4, pp. 555-562 (2000)	6, 15
Y	EP 990663 A2 (三共株式会社) 2000. 04. 05 & JP 2000-166574 A	6, 15

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲30-32のモノクローナル抗体に係る発明は、その他の請求の範囲に記載されたヒト肝細胞増殖方法に関連する発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、本願の請求の範囲には2個の発明が記載されているものと認められる。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.